



<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/67, 15/52, C12P 13/04, 13/14, 19/38, C12N 9/02, 9/10, 1/21</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/18935</p> <p>(43) 国際公開日 2000年4月6日(06.04.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05175</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月22日(22.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/271786 1998年9月25日(25.09.98) 特願平10/271787 1998年9月25日(25.09.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目15番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 朝倉陽子(ASAKURA, Yoko)(JP/JP) 中村 純(NAKAMURA, Jun)(JP/JP) 菅野壮平(KANNO, Sohei)(JP/JP) 菅美喜子(SUGA, Mikiko)(JP/JP) 木村英一郎(KIMURA, Eiichiro)(JP/JP) 伊藤久生(ITO, Hisao)(JP/JP) 松井和彦(MATSUI, Kazuhiko)(JP/JP) 中松 亘(NAKAMATSU, Tsuyoshi)(JP/JP) 倉橋 修(KURAHASHI, Osamu)(JP/JP) 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p>	<p>大住 剛(OHSUMI, Tsuyoshi)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目15番1号 味の素株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 中村 稔, 外(NAKAMURA, Minoru et al.) 〒100-8355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル646号 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: <b>PROCESS FOR CONSTRUCTING AMINO ACID-PRODUCING BACTERIUM AND PROCESS FOR PRODUCING AMINO ACID BY FERMENTATION METHOD WITH THE USE OF THE THUS CONSTRUCTED AMINO ACID-PRODUCING BACTERIUM</b></p> <p>(54) 発明の名称 アミノ酸生産菌の構築方法及び構築されたアミノ酸生産菌を用いる醗酵法によるアミノ酸の製造法</p> <p>(57) Abstract A process for preparing a coryne bacterium having an improved amino acid- or nucleic acid-productivity which comprises constructing mutants of the coryne bacterium by mutating the promoter sequence of an amino acid or nucleic acid biosynthesis gene on the chromosome of the coryne bacterium so as to bring it close to the consensus sequence or by genetic recombination, culturing the resultant mutants and then taking up therefrom a mutant producing the amino acid or the nucleic acid at a high yield. By using this process, the expression dose of a target gene can be adequately strengthened and controlled without resort to any plasmid and a mutant capable of producing an amino acid at a high yield can be constructed by genetic recombination or mutation.</p> <div data-bbox="885 1260 1445 1921"> </div>		

コリネ型細菌の染色体上のアミノ酸又は核酸生合成系遺伝子のプロモーター配列に、コンセンサス配列に近づくような変異を起こさせるか又は遺伝子組換えにより導入して、コリネ型細菌の変異体を調製し、該変異体を培養して目的とするアミノ酸又は核酸の産生量の多い変異体を採取することを含むアミノ酸又は核酸産生能が向上したコリネ型細菌の調製方法。この方法によれば、プラスミドを用いることなく目的遺伝子の発現量の適度な強化および調節を行うことができ、アミノ酸を高収率で生産する能力を有する変異株を遺伝子組換え又は変異により構築できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	セントルシア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロバキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
		KR	韓国				

## 明細書

## アミノ酸生産菌の構築方法及び構築されたアミノ酸生産菌を用いる醗酵法によるアミノ酸の製造法

## 発明の背景

本発明は、アミノ酸を高収率で生産する能力を有する変異株を構築する方法及びその変異株を用いる発酵法によるL-アミノ酸の製造方法に関するものである。

発酵法によるアミノ酸の生産に用いられる変異株の構築方法は、大別すると2通りあり、1つは化学変異剤をもちいてDNAにランダムに変異を導入する方法であり、もう1つは遺伝子組換えを用いる方法である。遺伝子組換えを用いる方法では、目的物質の生合成に関与する代謝経路上の遺伝子を強化したり、分解に関与する酵素の遺伝子を弱化したりすることにより、目的物質の生産性が向上した菌株を開発出来る。また、その際に、目的遺伝子を強化する方法として、細胞内で、染色体とは独立して自立複製可能なプラスミドが主に用いられてきた。

しかし、プラスミドを用いた目的遺伝子の強化方法には問題点がある。具体的には目的遺伝子の強化の程度はプラスミド自体のコピー数によって決まるため、目的遺伝子の種類によってはコピー数が高過ぎて、発現量が高くなり過ぎることにより、生育が著しく抑制されたり、逆に目的物質の生産能が低下したりする例が多くある。この様な場合、コピー数が低い種類のプラスミドを用いることにより、目的遺伝子の強化の程度を下げる事が可能であるが、プラスミドの種類は多くの場合限定的であり、目的遺伝子の発現レベルを自由に調節することは不可能である。

もう一つの問題点は、プラスミドの複製が不安定であることがしばしばであり、プラスミドが脱落してしまうことである。

例えば、特開昭61-268185号公報には、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）産生遺伝子（グルタミン酸脱水素酵素遺伝子）を含むDNA断片と細胞内での自立複製に必要な遺伝子を含

むDNA断片(プラスミド)とを含む組換え体DNAが開示されており、この組換え体DNAを細胞に導入することによって、GDH強化株を育種することができ、微生物による物質(アミノ酸、蛋白質等)生産を改善できることが開示されている。

これに対して、特許第2520895号公報には、上記組換え体DNAをコリネバクテリウムに移入して該酵素活性が強化された菌株を作成し、この菌株を用いて醗酵法によりL-グルタミン酸を製造したが、その生産量や収率はまだまだ満足のものではなく、更にL-グルタミン酸の生産性を向上させることが望まれているとしている。そして、この要望は、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ産生遺伝子とイソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ICDH)の2種の遺伝子を含む組換え体DNAをグルタミン酸生産性コリネ型細菌に移入することにより、達成できたとしている。

一方、特表平6-502548号公報には、コリネバクテリア菌株と、該菌株中の発現のための第一機能性DNA配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードする第二DNA配列、及び上記第一及び第二DNA配列の間に挿入された第三DNA配列を含む分泌カセットとを含んでなり、該第三DNA配列が該コリネバクテリア菌株によりアミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質の分泌を保証するPS1又はPS2から選ばれた蛋白質の要素をコードすることを特徴とするコリネバクテリアの発現及び分泌系が開示されている。具体的には、ポリペプチドの分泌が開示されており、コリネバクテリア菌株にNTG変異誘発を施し、グルタミン酸アナログである4-フルオログルタミン酸4-fluoroglutamate (4FG)に対して耐性を与える変異株を選び、これをpCGL141での形質転換に付しており、上記アナログ耐性菌の中からGDHの発現が強化された株が取得できることが開示されている。ここでは、GDHプロモーターのヌクレオチド配列251~266に変異が生じていることが示されている。

#### 発明の開示

本発明は、プラスミドを用いることなく目的遺伝子の発現量の適度な強化およ



び調節を行うことができ、アミノ酸を高収率で生産する能力を有する変異株を遺伝子組換え又は変異により構築する方法を提供することを目的とする。

本発明は、副生アスパラギン酸およびアラニンの著しい増加を引き起こすことなく、コリネバクテリア菌株にグルタミン酸を高収率で生産する能力を付与することができるGDH用プロモーターを提供することを目的とする。

本発明は、又、上記GDH用プロモーター配列を持つGDH遺伝子を提供することを目的とする。

本発明は、又、上記遺伝子を有するL-グルタミン酸生産性コリネバクテリア菌株を提供することを目的とする。

本発明は、構築されたアミノ酸生産菌を用いる醗酵法によるアミノ酸の製造法を提供することを目的とする。

本発明は、コリネ型グルタミン酸生産菌を用いる、グルタミン酸の収率を向上させ、より安価にグルタミン酸を製造するグルタミン酸発酵法を提供することを目的とする。

本発明は、染色体上のアミノ酸生合成系遺伝子のプロモーターを様々に改変し、目的とする遺伝子の発現量を調節することにより上記課題を効率的に解決できるとの知見に基づいてなされたものである。特に、プロモーターの特異的領域である-35領域および/または-10領域に特定の変異を導入することにより上記課題を効率的に解決できるとの知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は、コリネ型細菌の染色体上のアミノ酸又は核酸生合成系遺伝子のプロモーター配列に、コンセンサス配列に近づくような変異を起こさせるか又は遺伝子組換えにより導入して、コリネ型細菌の変異体を調製し、該変異体を培養して目的とするアミノ酸又は核酸の産生量の多い変異体を採用することを特徴とするアミノ酸又は核酸産生能が向上したコリネ型細菌の調製方法を提供する。

本発明は、又、-35領域に CGGTCA、TTGTCA、TTGACA 及び TTGCCA からなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列及び/又は-10領域に TATAAT 配列若しくは該配列の ATAAT の塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能

を阻害しない配列を有することを特徴とするグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）産生遺伝子用プロモーターを提供する。

本発明は、又、上記プロモーターを有するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ産生遺伝子を提供する。

本発明は、又、上記遺伝子を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌を提供する。

本発明は、また、上記の方法で構築したアミノ酸又は核酸産生能が向上したコリネ型細菌を、培地で培養し、培地中に目的のアミノ酸又は核酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを特徴とする発酵法による該アミノ酸又は核酸の製造方法を提供する。

本発明は、また、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌を、液体培地で培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを特徴とする発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、変異プロモーターを有するGDH遺伝子の構築フローを示す。

図2は、変異プロモーターを有するCS遺伝子の構築フローを示す。

図3は、レポーター遺伝子として lacZ を有するシャトルベクターの構築フローを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明でいうコリネ型グルタミン酸生産菌とは、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌を含み(In t. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。したがって、本発明で使用する変異株は、ブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属に属する下記のようなコリネ型グルタミン酸生産菌から誘導することができる。尚、本明細書において、

グルタミン酸生産性に言及しない場合は、コリネバクテリウム属細菌及びブレビバクテリウム属細菌を単にコリネ型細菌ということがある。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032
ブレビバクテリウム・ディバリカタム	ATCC14020
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム	ATCC13869
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC15990
ブレビバクテリウム・フラバム	ATCC14067
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
ブレビバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC14068
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス	AJ12310(FERM 9246)

目的物質としてのアミノ酸としては、生合成に関与する遺伝子およびそのプロモーターが明らかになっているものであれば何でもよい。生合成に関与する酵素の例として具体的には、グルタミン酸発酵の場合には、GDH、クエン酸合成酵素(CS)、イソクエン酸合成酵素(ICDH)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)、アコニターゼ(ACO)等が有効である。

リジン発酵では、アスパルテートカイネース(AK)、ジヒドロジビコリネートシンターゼ、ジヒドロジビコネートレダクターゼ、ジアミノピメレートデヒドロゲナーゼ、ジアミノピメレートデカルボキシラーゼなどの生合成系酵素に加え、リジンの膜排出に関与するリジン排出蛋白(lysE 遺伝子)も同様に有効である。

アルギニン発酵では、N-アセチルグルタミン酸シンターゼ、N-アセチルグ

ルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ及びアルギニノサクシナーゼによって触媒される反応で生成する。そして、これらの酵素が有効である。また、これらの酵素は、順に argA、argB、argC、argD、argE、argF、argG、argH の各遺伝子によってコードされている。

セリン発酵では、3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホセリントランスアミナーゼ、ホスホセリンホスファターゼ等の酵素が有効である。

フェニルアラニン発酵では、デオキシアラビノヘプツロン酸リン酸合成酵素、3-デヒドロキナ酸合成酵素、3-デヒドロキナ酸デヒドラターゼ、シキミ酸デヒドロゲナーゼ、シキミ酸キナーゼ、5-エノールビルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素、コリスミ酸合成酵素、コリスミ酸ムターゼ、プレフェン酸デヒドラターゼ等の生合成酵素が有効である。また、トランスケトラーゼ、トランスアルドラーゼ、フォスフォエノールビルビン酸合成酵素等の糖代謝系酵素も有効である。

トリプトファン発酵では、上記フェニルアラニン発酵で有効と考えられる諸酵素、セリン発酵で有効と考えられる諸酵素に加えて、トリプトファンオペロンに属する酵素が有効である。

プロリン発酵では、上記グルタミン酸発酵で有効と考えられる諸酵素に加え、 $\gamma$ -グルタミルキナーゼ、 $\gamma$ -グルタミルセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ピロリン-5-カルボキシレートレダクターゼ等が有効である。

グルタミン発酵では上記グルタミン酸発酵で有効と考えられる諸酵素に加え、グルタミンシンテターゼが有効である。

イノシン生産においては5-ホスホリボシル1-ニリン酸合成酵素、5-ホスホリボシル1-2リン酸アミノトランスフェラーゼ、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシアミドホルミルトランスフェラーゼなどの酵素の発現強化が有効であると考えられる。

グアノシン生産においては5-ホスホリボシル1-2リン酸合成酵素、5-ホ

スホリボシル 1-2 リン酸アミノトランスフェラーゼ、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシアミド ホルミルトランスフェラーゼに加えて 5'-イノシン酸デヒドロゲナーゼ、5'-キサンチル酸アミナーゼの発現強化が有効であると考えられる。

アデノシン生産においては 5-ホスホリボシル 1-2 リン酸合成酵素、5-ホスホリボシル 1-2 リン酸アミノトランスフェラーゼ、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシアミド ホルミルトランスフェラーゼに加えて、アデニロサクシネートシンテターゼの発現強化が有効であると考えられる。

ヌクレオチド生産においてはフォスフォリボシルトランスフェラーゼやイノシンキナーゼ、グアノシンキナーゼ、アデノシンキナーゼの発現強化が有効であると考えられる。

本発明では、コリネ型アミノ酸生産菌の染色体上の所望のアミノ酸生合成系遺伝子のプロモーター配列、例えば、上記 GDH 用プロモーターなどのプロモーター配列に、コンセンサス配列に近づくような変異を、化学薬品などを用いる変異により起こさせるか又は該変異を遺伝子組換えにより導入して、コリネ型アミノ酸生産菌の変異体を調製する。

ここで、コンセンサス配列は、多くのプロモーター配列を比較して最も高頻度で出現する塩基を並べた配列である。このようなコンセンサス配列としては、大腸菌、バチルス サブチリスなどのコンセンサス配列があげられる。大腸菌のコンセンサス配列は、Diane K. Hawley and William R. McClure Nuc. Acid. Re s. 11:2237-2255(1983)に記載されており、バチルス サブチリスのコンセンサス配列は、Charles et al. Mol. Gen. Genet 186:339-346(1982)に記載されている。

上記変異は、1つのプロモーター配列、例えば、GDH 用プロモーターのみに起こさせてもよいが、2つ以上のプロモーター配列、例えば、GDH 用プロモーター、クエン酸合成酵素 (CS) やイソクエン酸合成酵素 (ICDH) に起こさせてもよい。

本発明では、このようにして得られた該変異体を培養して目的とするアミノ酸

の産生量の多い変異体を採取する。

グルタミン酸発酵の場合に、コリネ型グルタミン酸生産菌のGDHはそれ自身のプロモーター配列をその上流域に持つことが明らかになっている (Sahm et al. Molecular Microbiology(1992), 6, 317-326)。

例えば、本発明のGDH用プロモーター、該GDH用プロモーター配列を持つGDH遺伝子及び該遺伝子を有するL-グルタミン酸生産性コリネバクテリア菌株は、例えば次のようにして得ることができる。

つまり、上記のような菌株に紫外線照射、X線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の変異処理を施し、4-フルオログルタミン酸を含有する寒天平板培地上で、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有する菌株を得る。すなわち、親株の生育を抑制する濃度の4-フルオログルタミン酸を含有する寒天平板培地上に変異処理を施した菌株を塗布し、生育してきた変異株を分離すればよい。

又、GDH遺伝子のプロモーター配列を、部位特異的変異法を用いて各種変異を導入した配列に置換したものを多数作製し、それぞれの配列とGDH活性との関係を調べて、L-グルタミン酸生産性の高いものを選択することができる。

本発明では、特に、GDH遺伝子のプロモーターの-35領域のDNA配列がCGGTCA、TTGTCA、TTGACA及びTTGCCAからなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列となっているか、及び/又は該プロモーターの-10領域のDNA配列がTATAATとなっているか、若しくは-10領域にTATAAT配列のATAATの塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列となっているものが好ましい。-10配列のTATAAT配列のATAATの塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列となっているものを選択できるのは、野生型の-10配列であるCATAATの最初の「C」を「T」に代えただけで劇的にGDH比活性の上昇が観察されたので(表1、p6-4参照)、他の塩基にかえてもかまわないと考えられるからである。

GDH遺伝子のプロモーター配列は、例えば、前出のSahm et al. Molecular Microbiology(1992), 6, 317-326に記載されており、又、配列番号1に記載されている。又、GDH遺伝子自体の配列は、例えば、同じくSahm et al. Molecula

r Microbiology(1992), 6, 317-326 に記載されており、又、配列番号 1 に記載されている。

同様に、クエン酸合成酵素 (CS) やイソクエン酸合成酵素 (ICDH) のプロモーターについても変異を起こさせることができる。

このようにして、GDH 用プロモーターとしては、-35 領域に CGGTCA、TTGTCA、TTGACA 及び TTGCCA からなる群から選ばれる少なくとも一種の DNA 配列及び／又は -10 領域に TATAAT 配列若しくは該配列の ATAAT の塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものがあげられる。又、上記プロモーターを有するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ産生遺伝子を提供する。

CS 用プロモーターとしては、-35 領域に TTGACA 配列及び／又は -10 領域に TATAAT 配列を有しており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものがあげられる。又、上記プロモーターを有する CS 遺伝子を提供する。

ICDH 用プロモーターとしては、-35 領域の第一又は第二のプロモーターに TTGCCA 配列及び TTGACA 配列のいずれか及び／又は -10 領域の第一又は第二のプロモーターに TATAAT 配列を有しており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものがあげられる。又、上記プロモーターを有する icd 遺伝子を提供する。

PDH 用プロモーターとしては、-35 領域に TTGCCA 配列及び／又は -10 領域に TATAAT 配列を有しており、プロモーター機能を阻害しない配列をものがあげられる。又、上記プロモーターを有する PDH 遺伝子を提供する。

本発明は、又、上記遺伝子を有するコリネ型 L-グルタミン酸生産菌を提供する。

アルギニノコハク酸シンターゼ用プロモーターとしては、-35 領域に TTGCCA、TTGCTA 及び TTGTCA からなる群から選ばれる少なくとも一種の DNA 配列及び／又は -10 領域に TATAAT 配列若しくは該配列の ATAAT の塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものがあげられる。又、上記プロモーターを有するアルギニノコハク酸シンターゼ遺伝子を提供する。

本発明は、又、上記遺伝子を有するコリネ型アルギニン生産菌を提供する。

本発明のコリネ型アミノ酸、好ましくはL-グルタミン酸生産菌を、液体培地に培養し、培地中に所望のアミノ酸、好ましくはL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することによりアミノ酸を得ることができる。

本発明において上記菌株の培養に用いられる液体培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、生育因子等を含有する通常の栄養培地が用いられる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物等の炭水化物、エタノール、グリセロール等のアルコール類、酢酸等の有機酸類が使用される。窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、アンモニア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・ステープ・リカー等が使用される。栄養要求性を有する変異株を用いる場合には、それらの要求物質を標品もしくはそれを含む天然物として添加するのがよい。

コリネ型細菌は一般に、ビオチン制限下でL-グルタミン酸を生産する。従って、培地中のビオチン量を制限するか、界面活性剤やペニシリンなどのビオチン作用抑制物質を添加する。

発酵は、振とう培養や通気攪拌培養等による好気条件下にて、培養液のpHを5～9の間に保持しつつ2～7日間行うのがよい。pHの調節には、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水等を用いるのがよい。培養温度は24～37℃であるのが好ましい。

培養液中に生成蓄積したL-グルタミン酸の採取は常法によって行えばよく、例えばイオン交換樹脂法、晶析法等によることができる。具体的には、L-グルタミン酸を陰イオン交換樹脂により吸着、分離させるか、または中和晶析させればよい。

本発明によれば、コリネ型アミノ酸生産菌のアミノ酸生合成遺伝子のプロモーター領域に変異を導入し、目的遺伝子の発現量を調節することにより、目的アミノ酸を高収率で得ることができ、又プラスミドのように脱落がなく、安定して目的アミノ酸を高収率で得ることができるので、工業的に大きな利点がある。

また、本発明によれば、副生アスパラギン酸およびアラニンの増加を引き起こ



すことなく、コリネバクテリア菌株にアミノ酸、特にグルタミン酸を高収率で生産する能力を付与することができる各種プロモーター、特にGDH用プロモーターを提供することができる。

また、本発明によれば、コリネ型L-グルタミン酸生産菌に変異処理を施し、変異がGDH遺伝子のプロモーター領域に起こった、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有する菌株を採取し、この菌株を培養することによりグルタミン酸を高収率で得ることができるので、工業的に大きな利点がある。

次に実施例により本発明を説明する。

#### 実施例1：変異型GDHプロモーターの作製

部位特異変異法を用い：次の方法で変異型GDHプロモーターを調製した。

##### (1) 各種変異型のプロモーターを持つGDH遺伝子の作製

コリネ型細菌のGDH遺伝子のプロモーターの-35領域および-10領域の野生型配列を配列1に示す。但し、野生型のプロモーター配列は既に報告されている(Molecular Microbiology (1992), 6, 317-326)。

変異型プロモーターを持つGDH遺伝子を運ぶプラスミドの作製方法は、以下の通りである。図1に示すように、“Bacterial Genome DNA purification kit”(Advanced Genetic Technologies Corp.)に基づいて調製したコリネ型細菌野生株 ATCC13869 株の染色体遺伝子を鋳型とし、GDH遺伝子上流と下流とでPCRにより遺伝子を増幅し、両端を平滑末端化した後に、それをプラスミド pHSG39 (宝酒造社製)の SmaI 部位に挿入した。次にこのプラスミドの SalI 部位に、コリネ型細菌で複製可能な複製基点をもつプラスミド pSAK4 から取得した複製起点を導入することによりプラスミド pGDH を作製した。この方法において、GDH遺伝子上流側のプライマーとして配列表1から6に示す配列を持つプライマーを用いることにより、上記のおのおのプロモーター配列を持つGDH遺伝子を作製することが出来る。なお、ここで用いたPCR増幅断片中には導入したプロモーター配列内の変異以外は変異は導入されていないことを塩基配列の決定により確認した。pSAK4を構築するためには、既に取得されているコリネバクテリア属細菌で自律複製可能なプラスミド pHM1519(Agric. Biol. Chem., 48, 2901

-2903(1984))由来の複製起点を持つプラスミド pHK4 (特開平 5-7491 号) を制限酵素 BamHI 及び KpnI で消化して、複製起点を含む DNA 断片を取得し、得られた断片を DNA 平滑末端化キット (宝酒造社製、Bluntingkit) を用いて平滑末端化した後 Sal I リンカー (宝酒造社製) を結合し、これを pHSG299 の Sal I サイトに挿入した。得られたプラスミドが pSAK4 である。

## (2) 各プロモーター配列を有する GDH の発現量の比較

上記の様にして作製したプラスミドをコリネ型細菌野生株 ATCC13869 株にそれぞれ導入した。導入の方法はエレクトロポレーション法を用いた (特開平 2-207791 号公報参照)。作製したこれらの菌株の GDH の発現量を比較するために、GDH の比活性を調べた。活性測定方法は上記の Sahm 等の方法に従った。その結果を表 1 に示す。

表 1

菌 株	プロモーター配列		GDH 比活性	相対値
	-35	-10		
ATCC 13869	TGGTCA	CATAAT	7.7	0.1
/pGDH	TGGTCA	CATAAT	82.7	1.0
/p6-2	CGGTCA	CATAAT	33.1	0.4
/p6-4	TGGTCA	TATAAT	225.9	2.7
/p6-3	TTGACA	TATAAT	327.2	4.0
/p6-7	TTGCCA	TATAAT	407.0	4.9
/p6-8	TTGTCA	TATAAT	401.3	4.9

上記 ATCC 13869/p6-2~ATCC 13869/p6-8 は配列番号 2~6 に対応するものであり、これらの配列は配列番号 1 記載の配列 (野生型) を基に下線部を下記の通り変更したものである。

配列番号 1      5' -TTAATTCTTTGTGGTCATATCTGCGACACTGC CATAATTTGAACGT- 3'  
 配列番号 2                      CGGTCA                      CATAAT

配列番号 3	TGGTCA	TATAAT
配列番号 4	TTGACA	TATAAT
配列番号 5	TTGCCA	TATAAT
配列番号 6	TTGTCA	TATAAT

尚、これらの配列は、直鎖状、2本鎖の合成DNAである。

## 実施例2：変異株の取得

### (1) 4-フルオログルタミン酸に対する耐性を有する変異株の誘導

AJ13029 株は W096/06180 に記載されるグルタミン酸生産株で、培養温度が 31.5°C ではグルタミン酸を生産しないが、培養温度を 37°C にシフトするとビオチン作用抑制物質の非存在下でもグルタミン酸を生産する変異株である。本実施例では、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ13029 株を変異株誘導の親株として用いた。もちろん、AJ13029 株以外のグルタミン酸生産株であっても 4-フルオログルタミン酸に対する耐性を有する変異株誘導の親株となりうる。

AJ13029 株を CM2B 寒天培地（表2）上にて 31.5°C で 24 時間培養して菌体を得た。得られた菌体を 250 µg/ml の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンの水溶液で 30°C で 30 分間処理した後、生存率 1% の当該菌体の懸濁液を 4-フルオログルタミン酸（4FG）を含む寒天平板培地（表3）に播種し、31.5°C で 20～30 時間培養しコロニーを形成させた。この際、初めに 1 mg/ml の 4FG を含む培地を傾斜をつけて作製し、その上に 4FG を含まない同培地を水平に重層した。これにより、寒天培地表面は 4FG の濃度勾配が作製される。このプレート上に上記変異処理菌体を播種すると、菌株の生育限界の領域を境に境界線が出来る。この境界よりも高濃度の 4FG が存在する領域でコロニーを形成した株を採種した。かくして約 10,000 個の変異処理菌株から約 50 株の 4FG 耐性株を取得した。

表2 CM2B 寒天培地

成 分	濃 度
ポリペプトン (日本製薬社製)	1.0%
酵母エキス (ディフコ社製)	1.0%
NaCl	0.5%
d-ビオチン	10 $\mu$ g / l
寒 天	1.5%
(pH 7.2 KOH で調整)	

表3 寒天培地

成 分	水 1 リットル 中 の 添 加 量
グルコース	10 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
MnSO <sub>4</sub> · 4 - 6H <sub>2</sub> O	0.01 g
サイアミン塩酸塩	0.2 mg
d-ビオチン	0.05 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	7.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.36 g
寒天	15 g

(2) 4 F G に対して耐性を示す変異株による L-グルタミン酸の生産能の確認  
 上記(1)において得られた約 50 株の変異株及びその親株である AJ13029 株について、グルタミン酸の生産能を以下のようにして確認した。

AJ13029 及び各変異株をそれぞれ CM2 B 寒天培地上にて 31.5℃ で 20 ~ 30 時間培養して得た菌体を表 4 の A 培地に示す組成の液体培地に接種し、31.5℃ で振とう培養を開始した。約 22 時間後、最終濃度が表 4 の B 培地に示す濃

度になるように新たに培地を添加し、37℃にシフトさせ、その後約24時間培養を行った。培養終了後、旭化成社製バイオテックアナライザーを用いてL-グルタミン酸の生成の有無を調べた。その結果、この約50株を培養しグルタミン酸収率が親株より高く、GDH活性も高い株を2株分離した（A株およびB株）。それぞれのGDH活性を測定したところ両株ともGDHの比活性が上昇していた（表5）。GDH活性の測定は E. R. Bormann 等の方法（Molecular Microbiol., 6, 317-326(1996)）に従った。そこでGDH遺伝子の塩基配列を解析したところGDHのプロモーター領域内にのみ変異点が存在していた（表6）。

表4

成 分	A培地		B培地	
グルコース	3	g/dl	5	g/dl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.14	g/dl	0.14	g/dl
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.04	g/dl	0.04	g/dl
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	g/dl	0.001	g/dl
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.001	g/dl	0.001	g/dl
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5	g/dl	2.5	g/dl
大豆蛋白加水分解液	1.5	ml/dl	0.38	ml/dl
サイアミン塩酸塩	0.2	mg/l	0.2	mg/l
ビオチン	0.3	mg/l	0.3	mg/l
消泡剤	0.05	ml/l	0.05	ml/l
CaCO <sub>3</sub>	5	g/dl	5	g/dl
pH 7.0 (KOH で調整)				

表5 変異株のグルタミン酸生成とGDH活性

菌 株	Glu(g/dl)	GDH比活性	相対値
-----	-----------	--------	-----

AJ13029	2.6	7.7	1.0
FGR1	2.9	23.1	3.0
FGR2	3.0	25.9	3.4

表6 変異株のGDHプロモーター領域の塩基配列

菌 株	GDHプロモーター配列		
	-35		-10
AJ13029	TGGTCA	TTCTGTGCGACACTGC	CATAAT
FGR1	TGGTCA	TTCTGTGCGACACTGC	TATAAT
FGR2	TTGTCA	T-CTGTGCGACACTGC	TATAAT

### 実施例3 コリネ型グルタミン酸生産菌のCS遺伝子プロモーター領域への変異の導入

本実施例ではグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) およびクエン酸合成酵素 (CS) をコードする遺伝子のプロモーター強化株を作成した例を示す。

#### (1) gltA 遺伝子のクローニング

コリネ型細菌のクエン酸合成酵素をコードする遺伝子 gltA の塩基配列は既に明らかにされている (Microbiol. 140 1817-1828 (1994))。この配列をもとに配列番号7および配列番号8に示すプライマーを合成した。一方、Bacterial Genome DNA Purification Kit(Advanced Genetic Technologies Corp.)を用いて、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 の染色体 DNA を調製した。この染色体 DNA を 0.5 $\mu$ g、前記オリゴヌクレオチドをそれぞれ 10pmol、dNTP mixture(各 2.5mM)8 $\mu$ l、10 $\times$  LA Taq Buffer (宝酒造) 5 $\mu$ l、LA Taq (宝酒造) 2U に滅菌水を加えて全量 50 $\mu$ l の PCR 反応液を調製した。この反応液をサーマルサイクラーTP240 (宝酒造) を用いて、変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、会合 55 $^{\circ}$ C 15 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 3 分の条件で 30 サイクルの PCR を行ない、gltA 遺伝子およびそのプロモーターを含む約 3 Kbp の DNA 断片を増幅した。得られた増幅断片は宝酒

造社製の SUPREC02 にて精製した後平滑末端化した。平滑末端化は宝酒造社製の Blunting Kit により行なった。これと pHSG399 (宝酒造) を SmaI で完全分解したものを混合し連結した。連結反応は宝酒造社製 DNA ligation kit ver2 にて行なった。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を用いて形質転換を行い、IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド) 10  $\mu$ g/ml、X-Gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド) 40  $\mu$ g/ml 及びクロラムフェニコール 40  $\mu$ g/ml を含む L 培地 (バクトトリプトン 10g/l、バクトイーストエキストラクト 5g/l、NaCl 5g/l、寒天 15g/l、pH7.2) に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

形質転換株からアルカリ法 (生物工学実験書、日本生物工学会編、105 頁、培風館、1992 年) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素地図を作成し、図 2 に示す制限酵素地図と同等であるものを pHSG399CS と名付けた。

#### (2) gltA プロモーターへの変異導入

gltA プロモーター領域への変異導入には宝酒造社製の Mutan-Super Express Km を用いた。具体的な方法を以下に示す。pHSG399CS を EcoRI, SalI で完全分解し、gltA 遺伝子を含む EcoRI-SalI 断片を調製し、これと pKF19km (宝酒造) を EcoRI, SalI で完全分解した断片とを連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造) を用いて形質転換を行い、IPTG 10  $\mu$ g/ml、X-Gal 40  $\mu$ g/ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からプラスミドを調製し、gltA 遺伝子を含むものを pKF19CS と名づけた。

pKF19CS を鋳型とし、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 に示す 5'末端リン酸化合成 DNA と Mutan super Express Km 付属の selection primer を用いて PCR を行なった。この PCR 産物を用いてエシェリヒア・コリ MV1184 のコンピテントセル (宝酒造) の形質転換を行ない、カナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質

転換株を得た。形質転換体よりプラスミド DNA を調製し、配列番号 1 2 に示す合成 DNA を用いて Sanger の方法 (J.Mol.Biol.,143,161,(1980)) で *gltA* プロモーター部の塩基配列を決定した。具体的には、塩基配列の決定には Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて Genetic Analyzer ABI310 (Applied Biosystems) で解析した。*gltA* プロモーター領域が表 7 に示す配列に置換されたものを、それぞれ pKF19CS1, pKF19CS2, pKF19CS4 と名づけた。

表 7

	-35 領域	-10 領域
pKF19CS	ATGGCT	TATAGC
pKF19CS1	ATGGCT	TATAAC
pKF19CS2	ATGGCT	TATAAT
pKF19CS4	TTGACA	TATAAT

### (3) 変異型 *gltA* プラスミドの構築

(2) で構築した pKF19CS, pKF19CS1, pKF19CS2, pKF19CS4 をそれぞれ SalI、EcoRI (宝酒造) で完全分解した。一方で、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミド pAM330 (特開昭 58-67699) 由来の複製起点を持つプラスミド pSFK6 (特願平 11-69896) を EcoRI, SalI で完全分解し、これと *gltA* を含む約 2.5kb の断片を連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセルを用いて形質転換を行い、IPTG 10  $\mu$ g/ml、X-Gal 40  $\mu$ g/ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からプラスミドを調製し、*gltA* 遺伝子を含むプラスミドをそれぞれ pSFKC, pSFKC1, pSFKC2, pSFKC4 とした。

### (4) 変異型 *gltA* プラスミドのコリネ型細菌における CS 発現量の測定

上記 (3) で構築したプラスミドをブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 に導入した。具体的には、電気パルス法を用い (特開平 2-07791)、



形質転換体の選択は 25  $\mu\text{g/ml}$  のカナマイシンを含む CM2B プレート培地 (バクトトリプトン 10g/l、バクトイーストエキストラクト 10g/l、NaCl 5g/l、ビオチン 10  $\mu\text{g/L}$ 、寒天 15g/l、pH7.0) で、31°Cにて行った。二晩培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し pSFKC, pSFKC1, pSFKC2, pSFKC4 を保持する形質転換体をそれぞれ BLCS, BLCS1, BLCS2, BLCS4 と名づけた。形質転換体を表 8 に示す培地に接種し、31°Cで培養を継続し、完全にグルコースを消費する前に培養を終了した。培養液を遠心し、菌体を分離した。菌体は 200m のグルタミン酸ナトリウムを含む 50mM のトリス緩衝液 (pH7.5) にて洗浄したのち、同緩衝液に懸濁し超音波破碎を行なった。超音波破碎は TOMY の UD-201 によった。超音波破碎後、10000g にて 20 分遠心を行ない、未破碎菌体を取り除いたものを粗酵素液とした。クエン酸合成酵素の活性の測定は (Methods Enzymol. 13, 3-11(1969)) にしたがって行なえばよい。具体的には TrisHCl 100mM(pH8), DTNB 0.1mM, グルタミン酸ナトリウム 200mM, アセチル CoA 0.3mM を含む反応液に粗酵素液を添加し、30°Cにおける 412nm の吸光度の増大を日立分光光度計 U-3210 で測定することにより求め、これをバックグラウンドとした。さらにオキサロ酢酸を終濃度 0.5mM となるよう添加し 412nm の吸光度の増大を測定し、バックグラウンドの値を差し引いた値をクエン酸合成酵素の活性とした。また、粗酵素液の蛋白質濃度の測定には Protein Assay (Bio-Rad) を用いた。標準蛋白質には牛血清アルブミンを用いた。測定結果を表 9 に示す。野生型の *gltA* プロモーターと比べて *gltA* プロモーター変異株ではクエン酸合成酵素活性が上昇していることが確認された。

表 8

成分	濃度
グルコース	50 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l

大豆蛋白加水分解物	20 ml/l
ビオチン	0.5 mg/l
サイアミン塩酸塩	2 mg/l

表 9

菌株	dABS/min/mg	相対活性	相対活性
野生株	6.8	1.0	
BLCS00	38.8	5.7	1.0
BLCS01	57.1	8.4	1.2
BLCS02	92.5	13.6	1.9
BLCS04	239.4	35.2	4.8

#### (5) 変異型 *gltA* 遺伝子の温度感受性プラスミドへの導入

変異型 *gltA* プロモーター配列の染色体への遺伝子組み込み方法としては、コリネ型細菌内で複製が温度感受性であるプラスミドを用いる方法が知られている(特開平 5-7491)。ここではコリネ型細菌内でその複製が温度感受性であるプラスミドベクターとして pSFKT2 (特願平 11-81693) を用いた。変異型 *gltA* プロモーター配列として pKFCS1, pKFCS2, pKFCS4 を SalI および BstPI で完全分解し平滑末端化したものを用い、これと pSFKT2 を SmaI で完全分解したものを連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル(宝酒造社製)を用いて形質転換を行い、IPTG 10  $\mu$ g/ml、X-Gal 40  $\mu$ g/ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からプラスミドを調製し、*gltA* 遺伝子を含む温度感受性シャトルベクターをそれぞれ pSFKTC1, pSFKTC2, pSFKTC4 と名づけた。

#### (6) 変異型 *gltA* プロモーターの染色体への導入

pSFKTC1, pSFKTC2, pSFKTC4 をそれぞれブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム FGR2 株に電気パルス法で導入した。形質転換体の選択は、25  $\mu$ g/ml の

カナマイシンを含む CM2B プレート培地で、25°Cにて行った。導入後、得られた株を CM2B 液体培地にて培養した後、25 µg/ml のカナマイシンを含む CM2B プレートに、プレートあたり  $10^3 \sim 10^5$  cfu となるよう希釈した後に塗布し、34°Cにて培養した。温度感受性プラスミドを保持した株は、この温度ではプラスミドの複製が阻害されるため、カナマイシン感受性となり、コロニーを形成できないが、染色体にプラスミド DNA を組み込んだ株は、コロニーを形成 するため、選択することができる。出現しコロニーを釣り上げ、単コロニー分離した。この株より染色体 DNA を抽出し、これを鋳型として配列番号 8 と配列番号 13 に示すプライマーを用い PCR を行ない、およそ 3 kb の増幅断片が確認した。したがってこの株は相同的な組換えにより、宿主染色体の *gltA* 遺伝子の近傍に、温度感受性プラスミド由来の変異型 *gltA* 遺伝子が組み込まれていることが示された。pSFKTC1,2,4 より誘導された株をそれぞれ BLCS11、BLCS12、BLCS14 と名づけた。

#### (7) *gltA* プロモーター置換株の取得

相同組換えにより、変異型 *gltA* 遺伝子を組み込んだ BLCS11、BLCS12、BLCS14 株より、まず、カナマイシン感受性株を取得した。プラスミド組み込み株を CM2B プレートに希釈、塗布し、34°Cで培養する。コロニー形成後、25 µg/ml のカナマイシンを含む CM2B プレートにレプリカし、34°Cで培養する。このとき、カナマイシン感受性になった株を取得した。

カナマイシン感受性になった株から、染色体を抽出し、配列番号 7 および配列番号 8 に示すプライマーを用いて PCR を行ない *gltA* 遺伝子断片を調製した。得られた増幅断片は宝酒造社製の SUPREC02 にて精製した後、配列番号 13 に示すプライマーを用いてシーケンス反応を行ない、そのプロモーター領域の配列を決定した。その結果、表 7 中の pKF19CS1 と同じプロモーター配列をもつ株を GB01、pKF19CS2 と同じプロモーター配列をもつ株を GB02、pKF19CS4 と同じプロモーター配列をもつ株を GB03 と名づけた。これらの株では、染色体からプラスミドおよび重複する *gltA* 遺伝子が脱落する際、プラスミドにより導入した変異型の *gltA* 遺伝子は染色体上に残り、元来染色体上にあった野生型の *gltA* 遺伝子が、ベクタープラスミドと共に脱落し、遺伝子置換が起こったことを意味する。

(8) *gltA* プロモーター変異株のクエン酸合成酵素活性測定

(7) で得られた FGR2, GB01, GB02, GB03 株及び FGR2/pSFKC 株を (4) に記載した方法と同様にしてクエン酸合成酵素の活性を測定した。測定結果を表 10 に示す。*gltA* プロモーター置換株はその親株に比しクエン酸合成酵素活性が上昇していることが確認された。

表 10

菌株	dABS/min/mg	相対活性
FGR2	7.9	1.0
GB01	9.5	1.2
GB02	15.0	1.9
GB03	31.6	4.0
FGR2/pSFKC	61.6	7.8

(9) *gltA* プロモーター置換株の培養成績

上記(7)で取得した各株を表 11 に示す組成の種培養培地に接種し、31.5°C に 24 時間振とう培養して種培養を得た。表 11 に示す組成の本培養培地を 500ml 容ガラス製ジャーファーマンターに 300ml ずつ分注し加熱殺菌した後、上記種培養を 40ml 接種した。攪拌速度を 800~1300rpm、通気量を 1/2~1/1vvm とし、培養温度 31.5°C で培養を開始した。培溶液の pH はアンモニアガスで 7.5 に維持した。培養を開始して 8 時間後に 37°C にシフトした。いずれも 20~40 時間でグルコースが完全に消費された時点で培養を終了し、培溶液中に生成蓄積された L-グルタミン酸の量を測定した。

その結果、表 12 に示すように GB01 や FGR2/pSFKC 株よりは、むしろ GB02 や GB03 株では L-グルタミン酸の大幅な収率向上が認められた。以上のことより、これらの株のグルタミン酸収率向上において、プロモーターに変異を導入し CS 活性を 2~4 倍に強めることで好成績となりうることを示された。

表 1 1

成 分	濃 度			
	種培養		本培養	
グルコース	50	g/l	150	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g/l	2	g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4	g/l	1.5	g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	mg/l	15	mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10	mg/l	15	mg/l
大豆蛋白加水分解	20	ml/l	50	ml/l
ビオチン	0.5	mg/l	2	mg/l
サイアミン塩酸塩	2	mg/l	3	mg/l

表 1 2

菌株	L-グルタミン酸(g/l)
FGR2	8.9
GB01	9.1
GB02	9.4
GB03	9.4
FGR2/pSFKC	9.1

実施例 4 コリネ型グルタミン酸生産菌の ICDH 遺伝子プロモーター領域への変異の導入

本実施例ではグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸合成酵素およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のプロモーター強化株を作成した例を示す。

#### (1) icd 遺伝子のクローニング

コリネ型細菌のクエン酸合成酵素をコードする遺伝子 icd の塩基配列は既に明らかにされている (J. Bacteriol. 177 774-782 (1995))。この配列をもとに配

列番号 14 および 15 に示すプライマーを合成し、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行ない、*icd* 遺伝子およびそのプロモーターを含む約 3 Kbp の DNA 断片を増幅した。得られた増幅断片は *EcoRI* にて完全分解し、これと pHSG399 (宝酒造) を *EcoRI* で完全分解したものを混合し連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセルを用いて形質転換を行い、IPTG 10  $\mu$ g/ml、X-Gal 40  $\mu$ g/ml 及びクロラムフェニコール 40  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

*icd* 遺伝子を有するプラスミドを pHSG399*icd* と名付けた。

## (2) *icd* プロモーターへの変異導入

*icd* 遺伝子の正確なプロモーターの位置は決定されていない。そこで、ICDH をコードする遺伝子上流配列をプロモーター様の配列に人為的に改変することにより、*icd* 遺伝子の mRNA 転写量を増大させうる可能性を検討した。具体的には、ICDH 蛋白質の第一 ATG から上流約 190bp (第一のプロモーター) 及び約 70bp (第二のプロモーター) の DNA 配列中に存在する -10 様領域に変異を導入した。

*icd* 遺伝子上流域への変異導入には宝酒造社製の Mutan-Super Express Km を用いた。具体的な方法を以下に示す。pHSG399*icd* を *PstI* で完全分解し、*icd* 遺伝子のプロモーターを含む *PstI* 断片を調製し、これと pKF18km (宝酒造) を *PstI* で完全分解した断片とを連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を用いて形質転換を行い、IPTG 10  $\mu$ g/ml、X-Gal 40  $\mu$ g/ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からプラスミドを調製し、*icd* 遺伝子のプロモーターを含むものを pKF18*icd* と名づけた。

pKF18*icd* を鋳型とし、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 に示す 5'末端リン酸化合成 DNA と selection primer を用い PCR を行なった。この PCR 産物を用いてエシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセルの形質転換を行ない、カナマイシン 25  $\mu$

g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換体よりプラスミド DNA を調製し、配列番号 22 に示す合成 DNA を用いて Sanger の方法 (J.Mol.Biol.,143,161,(1980)) で *icd* プロモーター部の塩基配列を決定した。具体的には、塩基配列の決定には Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて Genetic Analyzer ABI310 (Applied Biosystems) で解析した。*icd* プロモーター領域が表 7 に示す配列に置換されたものを、それぞれ pKF18ICD1, pKF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5, pKF18ICD6 と名づけた。このうち、pKF18ICD2 を PstI で完全分解し、*icd* 遺伝子のプロモーターを含む PstI 断片を調製し、これと pKF18kM (宝酒造) を PstI で完全分解した断片とを連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を用いて形質転換を行い、IPTG 10  $\mu$ g/ml、X-Gal 40  $\mu$ g/ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からプラスミドを調製し、*icd* 遺伝子のプロモーターを含むものを pKF18ICDM2 と名づけた。pKF18ICDM2 を鋳型とし、配列番号 20、配列番号 21 に示す 5'末端リン酸化合成 DNA と selection primer を用い PCR を行なった。この PCR 産物を用いてエシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセルの形質転換を行ない、カナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換体よりプラスミド DNA を調製し、配列番号 22 に示す合成 DNA を用いて *icd* プロモーター部の塩基配列を決定した。*icd* プロモーター領域が表 13 に示す配列に置換されたものを、それぞれ pKF18ICD25, pKF18ICD26 と名づけた。

表 13

プラスミド	プロモーター 1		プロモーター 2	
	-35	-10	-35	-10
pKF18ICD	GCGACT	GAAAGT	TTTCCA	CACCAT

pKF18ICD01	GCGACT	TATAAT	TTTCCA	CACCAT
pKF18ICD02	TTGACA	TATAAT	TTTCCA	CACCAT
pKF18ICD03	TTGACT	TAAAGT	TTTCCA	CACCAT
pKF18ICD04	GCGACT	GAAAGT	TTTCCA	TATAAT
pKF18ICD05	GCGACT	GAAAGT	TTGCCA	TATAAT
pKF18ICD06	GCGACT	GAAAGT	TTGACA	TATAAT
pKF18ICD25	TTGACA	TATAAT	TTGCCA	TATAAT
pKF18ICD26	TTGACA	TATAAT	TTGACA	TATAAT

### (3) プロモーター活性測定用プラスミドの構築

プロモーター活性を簡便に測定するためには、レポーター遺伝子を用いて間接的にプロモーター活性を測定する方法が考えられる。レポーター遺伝子として望まれる性質として、活性測定が簡単であること、N 末端側にアミノ酸が不可されても活性が著しく低下しないこと、バックグラウンドの反応がないこと、遺伝子操作をする上で適当な制限酵素切断部位があることが挙げられる。エシェリヒア・コリの  $\beta$  ガラクトシダーゼ (LacZ) は広くレポーター遺伝子として用いられており、またコリネバクテリウム属細菌にはラクトース資化能がないことから (J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 399-416 (1972))、レポーター遺伝子として LacZ を用いるのが最適であると判断した。そこで、LacZ をレポーター遺伝子として搭載するプラスミド pNEOL の構築を行なった (図 3)。以下その過程を詳細に記す。配列番号 23、配列番号 24 に示す合成 DNA をプライマーとして E. coli ME8459 (ME8459 は、日本の国立遺伝学研究所に寄託されている) から得られた染色体 DNA を鋳型として PCR を行なった。PCR 産物は SmaI、BamHI で完全分解した後、pKF3 (宝酒造) を HindIII で分解し平滑末端化したものとを連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を用いて形質転換を行い、カナマイシン  $25 \mu\text{g/ml}$  を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からプラスミドを調製し、pKF3nptII とした。次にこれを SalI で分解し、一



方で pSAK4 を、実施例 1 の (1) と同様にして SmaI, SalI で完全分解し平滑末端化したものを連結し、コリネ型細菌内で複製可能なシャトルベクター pNEO を構築した。このプラスミドは宿主にクロラムフェニコール耐性およびカナマイシン耐性を付与する。さらに pNEO を SmaI, Sse8387I で完全分解し、これと pMC1871 (ファルマシア バイオテック) を PstI, SmaI で完全分解したものを連結し、レポーター遺伝子として N 末端側の 8 アミノ酸を欠失した LacZ を有するコリネ型細菌内で複製可能なシャトルベクター pNEOL を構築した (図 3)。

#### (4) 変異型 *icd* プロモーター活性の測定

(2) で構築した変異型 *icd* プロモーターを有するプラスミド pKF18ICD1, pKF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5, pKF18ICD6, pKF18ICD25, pKF18ICD26 および pKF18ICD を SacII, PstI で完全分解した後、平滑末端化し、pNEOL を SmaI で切断したものと連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセルを用いて形質転換を行い、IPTG、X-Gal、クロラムフェニコール 40  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した青色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

形質転換株からプラスミドを調製し、ICDH と LacZ の融合たんぱく質が産生される構造のものを、pNEOICD1, pNEOICD2, pNEOICD3, pNEOICD4, pNEOICD5, pNEOICD6, pNEOICD25, pNEOICD26, pNEOLICD とした。これらのプラスミドおよび pNEOL を電気パルス法にてブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 に導入した。形質転換体の選択は 25  $\mu$ g/ml のカナマイシンおよび X-Gal 40  $\mu$ g/ml を含む CM2B プレート培地 (バクトトリプトン 10g/l、バクトイーストエキストラクト 10g/l、NaCl 5g/l、ビオチン 10  $\mu$ g/L、寒天 15g/l、pH7.0) で、31°C にて行った。二晩培養後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し pNEOICD1, pNEOICD2, pNEOICD3, pNEOICD4, pNEOICD5, pNEOICD6, pNEOICD25, pNEOICD26, pNEOLICD を保持する形質転換体をそれぞれ BLAC1, BLAC2, BLAC3, BLAC4, BLAC5, BLAC6, BLAC25, BLAC26, BLAC, BNEOL と名づけた。BNEO 以外の形質転換体はすべて青色のコロニーを形成していた。これらの形質転換体より実施例 3 (4) 記載の方法で粗酵素液を調製した。ただし、菌体

の洗浄および懸濁には緩衝液として、Z-Buffer(KCl 10mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, 2-ME 270  $\mu$ l/100mM-NaPi (pH7.5))を用いた。LacZ の活性の測定は以下の手順に従って行なった。Z-Buffer と粗酵素液を混合し、終濃度 0.8mg/ml となるように Z-Buffer に溶解した ONPG を添加し、30°Cにおける 420nm の吸光度の増大を日立分光光度計 U-3210 で測定した値を LacZ の活性とした。また、粗酵素液の蛋白質濃度の測定には Protein Assay(BIO-RAD)を用いた。標準蛋白質には牛血清アルブミンを用いた。測定結果を表 1 4 に示す。icd プロモーターに変異を有する ICDH-LacZ 融合蛋白を発現している株は、野生型の ICDH-LacZ 融合蛋白を発現している株に比べて LacZ 素活性が上昇していることが確認された。

表 1 4

菌株	dABS/min/mg	相対活性
BNEOL	Not detected	0.0
PNEOLI	42	1.0
BNEOLI-1	84	2.0
BNEOLI-2	168	4.0
BNEOLI-3	80	1.9
BNEOLI-4	126	3.0
BNEOLI-5	139	3.3
BNEOLI-6	84	2.0
BNEOLI-25	168	4.0
BNEOLI-26	170	4.0

#### (5) 変異型 icd 遺伝子の温度感受性プラスミドへの導入

コリネ型細菌内でその複製が温度感受性であるプラスミドベクター pSFKT2 (特願平 11-81693) を用いた。変異型 icd プロモーター配列として (pKF18ICD1, pKF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5, pKF18ICD6, pKF18ICD25, pKF18ICD26) を PstI で完全分解し、これと pSFKT2 を PstI で完全分解したものを連結した。連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を用

いて形質転換を行い、IPTG 10  $\mu$ g/ml、X-Gal 40  $\mu$ g/ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からプラスミドを調製し、icd プロモーターを含む温度感受性シャトルベクターをそれぞれ pSFKTI1, pSFKTI2, , pSFKTI3, pSFKTI4, pSFKTI5, pSFKTI6, pSFKTI25, pSFKTI26 と名づけた。

#### (6) 変異型 icd プロモーターの染色体への導入

(5) で構築したプラスミドをそれぞれブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム GB02 株に電気パルス法で導入した。形質転換体の選択は、25  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む CM2B プレート培地（バクトトリプトン 10g/l、バクトイーストエキストラクト 10g/l、NaCl 5g/l、ビオチン 10  $\mu$ g/L、寒天 15g/l、pH7.0）で、25°Cにて行った。導入後、得られた株を CM2B 液体培地にて培養した後、25  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む CM2B プレートに、プレートあたり  $10^3 \sim 10^5$  cfu となるよう希釈した後に塗布し、34°Cにて培養した。温度感受性プラスミドを保持した株は、この温度ではプラスミドの複製が阻害されるため、カナマイシン感受性となり、コロニーを形成できないが、染色体にプラスミド DNA を組み込んだ株は、コロニーを形成 するため、選択することができる。出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離した。この株より染色体 DNA を抽出し、これを鋳型として配列番号 13 と配列番号 15 に示すプライマーを用い PCR を行ない、およそ 3 kb の増幅断片を確認した。したがってこの株は相同的な組換えにより、宿主染色体の icd 遺伝子の近傍に、温度感受性プラスミド由来の変異型 icd 遺伝子が組み込まれていることが示された。

#### (7) icd プロモーター置換株の取得

相同組換えにより、変異型 icd 遺伝子を組み込んだ (6) 記載の株より、まず、カナマイシン感受性株を取得した。プラスミド組み込み株を CM2B プレートに希釈、塗布し、34°Cで培養する。コロニー形成後、25  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む CM2B プレートにレプリカし、34°Cで培養する。このとき、カナマイシン感受性になった株を取得した。

カナマイシン感受性になった株から、染色体を抽出し、配列番号 1 4、配列番号 1 5 にしめすプライマーを用いて PCR を行ない *icd* 遺伝子断片を調製した。得られた増幅断片は宝酒造社製の SUPREC02 にて精製した後、配列番号 2 2 に示すプライマーを用いてシーケンス反応を行ない、そのプロモーター領域の配列を決定した。その結果、pSFKTI1, pSFKTI2, , pSFKTI3, pSFKTI4, pSFKTI5, pSFKTI6, pSFKTI25, pSFKTI26 由来の *icd* プロモーター配列を有する株をそれぞれ GC01, GC02, GC03, GC04, GC05, Gc06, Gc25, 及び GC26 と名づけた。これらの株では、染色体からプラスミドおよび重複する *icd* 遺伝子が脱落する際に、プラスミドにより導入した変異型の *icd* 遺伝子が染色体上に残り、元来染色体上にあった野生型の *icd* 遺伝子が、ベクタープラスミドと共に脱落している。

#### (8) *icd* プロモーター変異株のイソクエン酸脱水素酵素活性測定

(7) で得られた 8 株ならびに GB02 株を実施例 3 (7) 記載の方法と同様にして ICDH 粗酵素液を調製した。ICDH の活性の測定は以下の手順に従って行なった。TisHCl 35mM(pH7.5), MnSO<sub>4</sub> 1.5mM, NADP 0.1mM, イソクエン酸 1.3mM を含む反応液に粗酵素液を添加し、30°C における 340nm の吸光度の増大を日立分光光度計 U-3210 で測定した値を ICDH の活性とした。また、粗酵素液の蛋白質濃度の測定には Protein Assay(BI0-RAD)を用いた。標準蛋白質には牛血清アルブミンを用いた。測定結果を表 1 5 に示す。*icd* プロモーター置換株はその親株に比しイソクエン酸脱水素酵素活性が上昇していることが確認された。

表 1 5

菌株	dABS/min/mg	相対活性
GB02	3.9	1.0
GC01	8.2	2.1
GC02	19.1	4.9
GC03	7.0	1.8
GC04	12.5	3.2
GC05	19.1	4.9

GC06	10.5	2.7
GC25	30.4	7.8
GC26	24.2	6.2

(9) *icd* プロモーター置換株の培養成績

(7) で取得した 8 株を、実施例 3 (9) 記載の方法と同様にして培養した。その結果、表 16 に示すように GC02, GC04, GC05, GC25 及び GC26 株では L-グルタミン酸の収率向上が認められた。*icd* プロモーターに変異を導入し ICDH 活性を 3 倍以上に強めることで好成績となりうることを示された。

表 16

菌株	L-グルタミン酸(g/l)
GB02	9.2
GC01	9.0
GC02	9.5
GC03	9.1
GC04	9.4
GC05	9.6
GC06	9.2
GC25	9.9
GC26	9.8

実施例 5 コリネ型グルタミン酸生産菌の PDH 遺伝子プロモーター領域への変異の導入

(1) コリネ型細菌からの *pdhA* 遺伝子のクローニング

大腸菌、緑膿菌および結核菌のビルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) の E1 サブユニット間で相同性の高い領域を選び、配列番号 25 および配列番号 26 に示すプライマーを合成し、Advanced Genetic Technologies Corp. 製 Bacterial Genomic DNA Purification Kit によって調整したブレビバクテリウム・ラク

トフェルメンタム ATCC 13869 の染色体を鋳型とし、PCR テクノロジー（ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989年）8頁に記載されている標準反応条件でPCRを行い、反応液をアガロースゲル電気泳動したところ、約1.3キロベースのDNA断片増幅していることが判明した。得られたDNAは、配列番号25および配列番号26の合成DNAを用いて両端の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製)を用いて Sanger の方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)) に従って行った。決定された塩基配列をアミノ酸に翻訳して、大腸菌、緑膿菌および結核菌のビルビン酸デヒドロゲナーゼの E1 サブユニットと比較したところ、相同性が高かったので、PCRにより増幅したDNA断片はブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 のビルビン酸デヒドロゲナーゼの E1 サブユニットをコードする *pdhA* 遺伝子の一部であると判断し、その遺伝子上流および下流部分のクローニングを行った。クローニングの方法は、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 染色体を制限酵素 *EcoRI*, *BamHI*, *Hind III*, *Pst I*, *Sal I*, *Xba I* (宝酒造社製)で消化したDNA断片から、上流部分をクローニングするために配列表配列番号27および配列番号28に示したプライマーを使い、下流部分をクローニングするために配列番号29および配列番号30に示したプライマーを使い、LA PCR in vitro cloning Kit (宝酒造製)を用いてクローニングを行った。このキットでPCRを行った結果、上流部分は *EcoRI*, *Hind III*, *Pst I*, *Sal I*, *Xba I* で消化した断片でそれぞれ約0.5, 2.5, 3.0, 1.5, 1.8キロベースのDNA断片が増幅され、また下流部分は *BamHI*, *Hind III*, *Pst I* で消化した断片でそれぞれ約1.5, 3.5, 1.0キロベースのDNA断片が増幅されたので、このDNA断片を上記と同様の方法で塩基配列の決定を行った。その結果、増幅されたDNA断片にはさらに約920アミノ酸のオープン・リーディング・フレームが含まれており、さらにその上流にはプロモーター領域と推定される領域が存在することも明らかとなった。このオープン・リーディング・フレームの塩基配列から推定される産物のアミノ酸配列は既知の大腸菌などのビルビン酸デヒドロゲナーゼの E

1 サブユニットと相同性が高いことから、このオープン・リーディング・フレームがブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 のビルビン酸デヒドロゲナーゼの E1 サブユニットをコードする *pdhA* 遺伝子であることが明らかとなった。このオープン・リーディング・フレームの塩基配列は配列表配列番号 31 に示す通りである。配列表配列番号 31 の配列には、その塩基配列から推定される産物のアミノ酸配列も示した。なお、タンパク質の N 末端にあるメチオニン残基は開始コドンである ATG に由来するためタンパク質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記タンパク質の場合にも N 末端側のメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。ただし、配列表配列番号 31 に示した ATG の 6 ベース上流に GTG の配列があり、ここからアミノ酸が翻訳されている可能性もある。また、大腸菌など他の微生物のビルビン酸デヒドロゲナーゼは、E1、E2 および E3 の 3 つのサブユニットから構成されており、これらをコードする遺伝子はオペロンであることが多いが、ここで明らかとなった *pdhA* 遺伝子の下流約 3 キロベース中にはビルビン酸デヒドロゲナーゼの E2 および E3 サブユニットと考えられるオープン・リーディング・フレームは存在しなかった。その代わり、このオープンリー・リーディング・フレームの下流にはターミネーターと推定される配列が存在していることが明らかとなっていることから、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 のビルビン酸デヒドロゲナーゼの E2 および E3 サブユニットは染色体上の他の部分に存在していると考えられた。

## (2) *pdhA* 増幅のためのプラスミドの構築

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 に *E. coli* の PDH を構成する 3 つのサブユニットをコードする遺伝子を導入した株はグルタミン酸収率が向上していることが既に明らかとなっている (特願平 10-360619)。しかし、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 の PDH は E1 サブユニットをコードする *pdhA* 遺伝子しかクローニングされておらず、この遺伝子単独での増幅がグルタミン酸収率に効果があるかは、まだ調べられていなかった。そこで *pdhA* 遺伝子単独増幅がグルタミン酸収率に効果があるか

を調べることにした。

既にクローニングされている塩基配列に基づいて配列番号 33 及び 34 に示すプライマーを合成し、Advanced Genetic Technologies Corp. 製 Bacterial Genomic DNA Purification Kit によって調整したブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 の染色体を鋳型とし、PCR テクノロジー（ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989 年）8 頁に記載されている標準反応条件で PCR を行い、pdhA 遺伝子を増幅した。合成したプライマーの内、配列番号 33 は、配列表配列番号 32 に記載されている pdhA 遺伝子の塩基配列図の 1397 番目から 1416 番目の塩基に至る配列に相当しており、配列番号 34 は、配列表配列番号 32 の 5355 番目から 5374 番目の塩基に至る配列に相当する塩基配列の逆ストランドを 5' 側から表記したものである。

生成した PCR 産物を常法により精製後、制限酵素 Sal I と EcoT22I を反応させ、制限酵素 Sal I と Pst I で切断した pSFK（特願平 11-69896）とライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行い、IPTG（イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド） $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、X-Gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド） $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  及びカナマイシン  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む L 培地（バクトトリプトン  $10 \text{g}/\text{l}$ 、バクトイーストエキストラクト  $5 \text{g}/\text{l}$ 、NaCl  $5 \text{g}/\text{l}$ 、寒天  $15 \text{g}/\text{l}$ 、pH 7.2）に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

形質転換株からアルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105 頁、培風館、1992 年）を用いてプラスミドを調製した後、ベクターに挿入された DNA 断片の制限酵素地図を作成し、配列表配列番号 32 に報告されている pdhA 遺伝子の制限酵素地図と比較し、同一制限酵素地図を有する DNA 断片が挿入されているプラスミドを pSFKBPDHA と名付けた。

（3）ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 および CG25 への pASFKBPDHA の導入と醗酵培養評価



ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 および G C 25 を電気パルス法（特開平 2-207791 号公報参照）によりプラスミド pSFKBPDHA で形質転換して、形質転換株を得た。ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 および G C 25 にプラスミド pSFKBPDHA を導入して得られた形質転換株 ATCC13869/pSFKBPDHA および G C 25/pSFKBPDHA を用いて L-グルタミン酸生産のための培養を以下のように行った。25  $\mu$ g/mL のカナマイシンを含む CM 2 B プレート培地にて培養して得た ATCC13869/pSFKBPDHA および GC25/pSFKBPDHA 株の菌体を、グルコース 80 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g、大豆加水分解液 15 ml、サイアミン塩酸塩 200  $\mu$ g、ビオチン 60  $\mu$ g、カナマイシン 25 mg 及び CaCO<sub>3</sub> 50 g を純水 1 L 中に含む培地に KOH を用いて pH 8.0 に調整されている) に接種し 31.5°C にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。得られた培養物を、GC25/pSFK6 及び GC25/pSFKBPDHA については上記と同じ組成の培地に、又 ATCC13869/pSFK6 及び ATCC13869/pSFKBPDHA については上記と同じようにビオチンを除いた培地に、5% 量接種し、37°C にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとしてブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 および G C 25 に、既に取得されているコリネバクテリウム属細菌で自律複製可能なプラスミド pSFK6 を電気パルス法（特開平 2-207791 号公報参照）により形質転換した菌株を上記と同様にして培養した。培養終了後、培養液中の L-グルタミン酸蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザー AS-210 により測定した。このときの結果を表 17 に示した。

表 17

菌株	L-グルタミン酸収率 (%)
ATCC13869/pSFK	3.6
ATCC13869/pSFKBPDHA	3.8

GC25/pSFK6	5.1
------------	-----

GC25/pSFKBPDHA	5.3
----------------	-----

---

これらの結果から、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 および GC25 において *pdhA* 遺伝子の単独増幅でも Glu 収率向上に効果があることが明らかとなった。

#### (4) 変異した *pdhA* プロモーター活性測定用のプラスミドの構築

ビルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) のプロモーター変異株の作製を行うために、既にクローニングがなされたブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 の *pdhA* 遺伝子のプロモーター領域の決定およびプロモーター領域の改変による発現量の違いの測定を  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定することによって行った。

クローニングを行って既に明らかとなっている塩基配列から *pdhA* 遺伝子のプロモーター部位を推定したところ、配列表配列番号 32 の 2252 番目から 2257 番目と 2279 番目から 2284 番目がそれぞれ -35 領域および -10 領域である可能性が高いことが推定された。そこで、配列表配列番号 35 及び 36 に示すプライマーを合成し、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型にして PCR 法により *pdhA* 遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片を増幅した。合成したプライマーの内、配列番号 35 は、配列表配列番号 32 の塩基配列の 2194 番目から 2221 番目の塩基に至る配列に相当するが、2198 番目の塩基を C に、2200 番目と 2202 番目の塩基を G に変更し、制限酵素 *Sma*I の認識配列を挿入している。配列番号 36 は、配列表配列番号 32 の塩基配列の 2372 番目から 2398 番目の塩基に至る配列に相当するが、2393 番目と 2394 番目の塩基を G に変更し、制限酵素 *Sma*I の認識配列を挿入した塩基配列の逆ストランドを 5' 側から表記したものである。Advanced Genetic Technologies Corp. 製 Bacterial Genomic DNA Purification Kit によって調整したブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 の染色体を鋳型とし、PCR テクノロジー (ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989年) 8頁

に記載されている標準反応条件でPCRを行い、pdhA 遺伝子のプロモーター領域を増幅した。生成したPCR産物を常法により精製後、制限酵素 SmaI を反応させ、lacZ 遺伝子のプロモーター領域を欠いるコリネ型細菌で複製が可能なpNEOL を制限酵素 SmaI で（実施例4の（3））切断したものとライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結した後、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行い、X-Gal（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド）40  $\mu$ g/ml及びカナマイシン 25  $\mu$ g/mlを含むL培地（バクトトリプトン10 g/l、バクトイーストエキストラクト5 g/l、NaCl 5 g/l、寒天15 g/l、pH 7.2）に塗布し、一晚培養後、出現した青色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からアルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年）を用いてプラスミドを調製した後、定法によりベクターに挿入されたDNA断片のシーケンスを行いDNA断片が挿入されているプラスミドを pNEOLBPDHAp01 と名付けた。

さらにプロモーター部位と推定される領域をコリネ型細菌のプロモーターの共通配列に変えたプラスミドを構築するために、配列表配列番号37, 38, 39に示すプライマーを合成し、これらのそれぞれのプライマーと配列表配列番号36に示すプライマーを用いて、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 の染色体DNAを鋳型にしてPCR法により pdhA 遺伝子のプロモーター領域を共通配列に変えたDNA断片を増幅した。合成したプライマーの内、配列番号37は、配列表配列番号32の塩基配列の2244番目から2273番目の塩基に至る配列に相当し、2255番目の塩基をCと2257番目の塩基をAに変更て、-35領域のみをコリネ型細菌の共通配列に変えたものに相当している。また、配列番号38は、配列表配列番号32の塩基配列の2249番目から2288番目の塩基に至る配列に相当し、2279番目と2281番目の塩基をTに変更て、-10領域のみをコリネ型細菌の共通配列に変えたものに相当している。また、配列番号39は、配列表配列番号32の塩基配列の2249番目から2288番目の塩基に至る配列に相当し、2255番目の塩基をCに、2257番目の塩基をAに、2279番目と2281番目

の塩基を T に変更て、-35 領域および-10 領域の両方をコリネ型細菌の共通配列に変えたものに相当している。Advanced Genetic Technologies Corp. 製 Bacterial Genomic DNA Purification Kit によって調整したブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 の染色体を鋳型とし、PCR テクノロジー（ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989 年）8 頁に記載されている標準反応条件で PCR を行い、これらのプライマーを使って、プロモーター領域を共通配列に変えた *pdhA* 遺伝子のプロモーター領域を増幅した。生成した PCR 産物を常法により精製後、制限酵素 *Sma*I を反応させ、*lacZ* 遺伝子のプロモーター領域を欠いるコリネ型細菌で複製が可能な pNEOL を制限酵素 *Sma*I で切断したものとライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結した後、*エシェリヒア・コリ* JM109 のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行い、X-Gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド）40  $\mu$ g/ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む L 培地（バクトトリプトン 10 g/l、バクトイーストエキストラクト 5 g/l、NaCl 5 g/l、寒天 15 g/l、pH 7.2）に塗布し、一晚培養後、出現した青色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からアルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105 頁、培風館、1992 年）を用いてプラスミドを調製した後、定法によりベクターに挿入された DNA 断片のシーケンスを行い、-35 領域のみを共通配列に変えた DNA 断片が挿入されているプラスミドを pNEOLBPDHAp<sub>ro</sub>35 と名付け、-10 領域のみを共通配列に変えた DNA 断片が挿入されているプラスミドを pNEOLBPDHAp<sub>ro</sub>35 と名付け、-35 領域および-10 領域を共通配列に変えた DNA 断片が挿入されているプラスミドを pNEOLBPDHAp<sub>ro</sub>3510 と名付けた。

#### （５）変異した *pdhA* プロモーター活性の評価

ここで構築した pNEOLBPDHAp<sub>ro</sub>1、pNEOLBPDHAp<sub>ro</sub>10、pNEOLBPDHAp<sub>ro</sub>3510 と名付けたプラスミドによって、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 を電気パルス法（特開平 2-207791 号公報参照）で形質転換して形質転換株を得た。得られた形質転換体の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を実施例

4 (4) に記載の方法により測定した。プロモーター領域を共通配列に変えた時の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、pdhA 遺伝子のプロモーター領域を持つ $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を1として、表18のような結果であった。

表18

菌株	$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (相対値)
ATCC13869/pNEOLBPDHAp1	1
ATCC13869/pNEOLBPDHAp10	6
ATCC13869/pNEOLBPDHAp3510	7.5

この結果は、推定したプロモーター部位が pdhA 遺伝子のプロモーターであることを意味しており、この領域を共通配列に変えることで、PdhA の発現量を変えること（増幅すること）ができることを示している。これは、pdhA 遺伝子のプロモーター領域を変えることで、プラスミドを使わずに発現量を変えることができることを示している。

#### (6) プロモーター変異株作製用プラスミドの構築

プロモーターに変異を起こさせることにより PdhA の発現量を変えられることが明らかとなったので、pdhA 遺伝子のプロモーター変異株を作製するためのプラスミドの構築を行った。プロモーター変異株構築用のプラスミドは、-35 領域および-10 領域をそれぞれ共通配列に変えたものとその両方を共通配列に変えたものの3種類の構築を行った。

##### 4-1) プロモーター変異株作製用プラスミドの構築

既にクローニングされている塩基配列に基づいて配列番号40、41に示すプライマーを新たに合成した。合成したプライマーの内、配列番号40は、配列表配列番号32の2491番目から2521番目の塩基に至る配列に相当する塩基配列の逆ストランドを5'側から表記したものの5'末端にAが3個連なった後にTが4個連なった配列を付与したものである。また、配列番号33は配列表配列番号32に記載されている pdhA 遺伝子の塩基配列図の5020番目から5039番目の塩

基に至る塩基配列の逆ストランドを5'側から表記したものである。Advanced Genetic Technologies Corp.製 Bacterial Genomic DNA Purification Kit によって調整したブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 の染色体を鋳型とし、プライマーとして配列表配列番号33および40を用いてPCRテクノロジー（ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989年）8頁に記載されている標準反応条件でPCRを行った。また、ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 13869 の染色体を鋳型とし、配列表配列番号15および17を用いてもPCRを行った。生成したPCR産物を常法により精製後、プライマーとして配列表配列番号9および16を用いたときのPCR産物と配列表配列番号39および41を用いたときのPCR産物および配列表配列番号33と41を用いてPCRを行った。このときの条件は、これら4つのDNAの濃度が10マイクロMとなるように反応液中に加えて、鋳型を入れずに LA taq（宝酒造社製）を用いてPCRを行った。生成したPCR産物は常法により精製後、制限酵素 Sal I と XhoI を反応させ、コリネ型細菌で複製可能な温度感受性プラスミド pSFKT2 を制限酵素 Sal I で切断したものとライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結した後、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行い、IPTG（イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド）10μg/ml、X-Gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトシド）40μg/ml及びカナマイシン 25μg/mlを含むL培地（バクトトリプトン10g/l、バクトイーストエキストラクト5g/l、NaCl 5g/l、寒天1.5g/l、pH7.2）に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。形質転換株からアルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年）を用いてプラスミドを調製した後、ベクターに挿入されたDNA断片のシーケンスを行い、配列表配列番号32に報告されている pdhA 遺伝子の塩基配列と比較し、プロモーターの-35領域と-10領域だけがコリネ型細菌の共通配列に変わっているDNA断片が挿入されているプラスミドを pSFKTPDHApro3510 と名付けた。

上記の方法の配列表配列番号 39 を配列表配列番号 37 および 38 にそれぞれ変えて、全く同様の方法で、pdhA 遺伝子のプロモーターの-35 領域をコリネ型細菌の共通配列に変えたプラスミドおよび pdhA 遺伝子のプロモーターの-10 領域をコリネ型細菌の共通配列に変えたプラスミドを構築した。これらのプラスミドはそれぞれ pSFKTDHpro35 および pSFKTPDHpro10 と名付けた。

#### (7) プロモーター変異株の作製

(6) で構築したプロモーター変異株作製のプラスミドを用いて、相同組み換えにより pdhA 遺伝子のプロモーター変異株の作製を行った。

まず、プロモーター変異株作製用プラスミド pSFKTPDHpro3510 を用いて G C 25 を電気パルス法 (特開平 2-207791 号公報参照) で形質転換を行い、CM2B プレート培地 (ポリペプトン 10 g/l、バクトイーストエキストラクト 10 g/l、NaCl 5 g/l、ビオチン 10 マイクロ g/ml、寒天 15 g/l、pH 7.2) に湿布して培養温度 25°C で形質転換株を得た。得られた形質転換株は、CM2B 液体培地で一晚試験管培養した後に、カナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む CM2B プレート培地に湿布して、培養温度 34°C で培養して、相同組み換えで染色体上にプラスミド pSFKTPDHpro3510 が挿入された 1 回組み換え株を得た。得られた 1 回組み換え株を単コロニー分離した後に、CM2B 液体培地に湿布して、培養温度 31.5°C で培養し、コロニーが出現してきたら、カナマイシン 25  $\mu$ g/ml を含む CM2B プレート培地にレプリカすることで、カナマイシン感受性株を取得した。取得された株の pdhA 遺伝子のプロモーター部位は野生株の配列の株と変異が導入されている株の 2 種類が得られるので、この部分のシーケンスを行うことで、pdhA 遺伝子のプロモーター部位に変異が導入されたプロモーター変異株を取得した。この株は、pdhA 遺伝子のプロモーターの-35 領域および-10 領域がコリネ型細菌の共通配列に変えた株であり、この株を GD3510 と名付けた。

また、上記のプロモーター変異株作製用プラスミド pSFKTPDHpro3510 をプロモーター変異株作製用プラスミド pSFKTPDHpro35 および pSFKTPDHpro10 に代えて、上記と全く同様の方法により、それぞれ pdhA 遺伝子プロモーターの-35 領

域および-10領域がコリネ型細菌の共通配列に変えた株を取得し、それぞれ GD35 および GD10 と名付けた。

#### (8) pdhA 遺伝子プロモーター変異株のフラスコ培養評価

取得した3種類の pdhA 遺伝子プロモーター変異株 GD3510、GD35、GD10 及び GC25 を用いて L-グルタミン酸生産のためのフラスコ培養を以下のように行った。CM2Bプレート培地にて培養して得たプロモーター変異株 GD3510、GD35、GD10 及び GC25 の菌体を、グルコース 30 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g、大豆加水分解液 15 ml、サイアミン塩酸塩 200  $\mu\text{g}$ 、ビオチン 60  $\mu\text{g}$  及び  $\text{CaCO}_3$  50 g を純水 1 L 中に含む培地に KOH を用いて pH 8.0 に調整されている) に接種し 31.5°C にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。得られた生成物を、上記と同様の組成の培地に 5% の濃度で接種し、培地中の糖が消費されるまで 37°C で振とう培養した。培養終了後、培養液中の L-グルタミン酸蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザー AS-210 により測定した。このときの結果を表 19 に示した。

表19

菌株	L-グルタミン酸 (g/dl)
GC25	1.9
GD35	2.0
GD10	2.0
GD3510	2.1

これらの結果から、取得したプロモーター変異株は Glu 収率が向上していることが明らかとなった。



## 実施例6 コリネ型アルギニン生産菌へのアルギノコハク酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域への変異の導入

### 1) argG 遺伝子上流領域の塩基配列決定

プレバクテリウム・フラバムの argG 遺伝子を PCR により増幅するために、同 ORF の上流及び下流の領域の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、公知のコリネバクテリウム・グルタミカムの argG 遺伝子の ORF の塩基配列 (GenBank accession AF030520) に基づいてプライマーを合成し、In vitro LA PCR cloning kit (宝酒造 (株) 製) を用いて、キットに添付の説明書に従って行った。前記プライマーとして具体的には、ORF の上流領域用には配列番号 42 及び 43 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (プライマー 1、2) を、下流領域用には配列番号 44 及び 45 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (プライマー 3、4) をそれぞれ用いた。プレバクテリウム・フラバムの野生株である 2247 株 (ATCC14067) の染色体 DNA を制限酵素 EcoRI で完全消化し、一次 PCR をプライマー 2 または 3 で行い、二次 PCR をプライマー 1 または 4 を用いて行うことにより、argG の上流、下流の塩基配列を決定した。

### 2) promoter 部位の予測

上記配列より、市販のソフト (GENETYX) を用いて、argG 遺伝子の ORF の上流にある promoter 様配列を検索した。最もスコアの高かった部位 (最初の ATG から約 120bp 上流) に変異を導入し、次いでプロモーターの活性を評価した。

### 3) promoter 配列への変異導入と変異型 promoter の活性測定

最もスコアの高かった部位に、変異導入用プライマー primer9 または primer10 または primer11 または primer12 または primer13 と primer7 (それぞれ配列番号 50、51、52、53、54、48) を用いて AJ12092 株の染色体 DNA を鋳型として 1 回目の PCR を行い、この PCR 産物を 3' 側の primer とし、primer8 (配列番号 49) を 5' 側の primer として再度同染色体 DNA を鋳型として PCR を行うことにより、目的の promoter 部分に変異が導入された DNA 断片を得た。次にこの変異型 promoter の活性を測定する為に、これらの DNA 断片を promoter probe vector pNEOL の SmaI サイトにリポーター遺伝

子の lacZ と順向きになるように挿入した plasmid pNEOL-1, pNEOL-2, pNEOL-3, pNEOL-4, pNEOL-7 を得た。また活性の対照として primer7 と primer8 を用いて AJ12092 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行って得た DNA 断片を同様に pNEOL の lacZ 遺伝子上流に挿入した plasmid pNEOL-0 を構築した。

pNEOL-0, pNEOL-1, pNEOL-2, pNEOL-3, pNEOL-4, pNEOL-7 を AJ12092 株に導入した。プラスミドの導入は電気パルス法（特開平 2-207791）を用いた。形質転換体は  $4\mu\text{g/ml}$  のクロラムフェニコールを含む CM 2 G プレート培地（ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 10 g, グルコース 5 g, NaCl 5 g, 寒天 15 g を純水 1 l に含む。pH 7.2）にてクロラムフェニコール耐性株として選択した。

これらの菌株をグルコース  $0.5\text{g/dl}$ , ポリペプトン  $1\text{g/dl}$ , 酵母エキス  $1\text{g/dl}$ , NaCl  $0.5\text{g/dl}$ , クロラムフェニコール  $5\mu\text{g/l}$  を含む寒天培地にぬりつけ  $31.5^\circ\text{C}$  で 20 時間培養して得た菌体 1 E-セを、グルコース  $3\text{g/dl}$ , 硫酸アンモニウム  $1.5\text{g/dl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.1\text{g/dl}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $0.04\text{g/dl}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $0.001\text{g/dl}$ ,  $\text{MnSO}_4$   $0.01\text{g/dl}$ ,  $\text{VB}_1$   $5\mu\text{g/dl}$ , biotin  $5\mu\text{g/dl}$ , 大豆加水分解物 N 量として  $45\text{mg/dl}$  を含む培地に植菌し、 $31.5^\circ\text{C}$  で 18 時間培養して得た菌体を用い、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

表 20 に示す様に AJ12092/pNEOL-0 で  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出されたことから、lacZ 構造遺伝子上流に挿入した DNA 断片が promoter として機能していることがわかった。また、AJ12092/pNEOL-0 に比して各 plasmid 導入株では  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が高くなっており、この promoter 様配列への変異導入により、転写活性が表 20 の様に上昇することが判った。

表 20

相対活性
(AJ12092/pNEOL-0=1)

AJ12092	nd
AJ12092/pNEOL-0	1.0
AJ12092/pNEOL-1	2.8
AJ12092/pNEOL-2	2.7
AJ12092/pNEOL-3	1.8
AJ12092/pNEOL-4	0.8
AJ12092/pNEOL-7	3.0

#### 4)変異導入用 plasmid の構築

primer14,15 (配列番号 55 と 56) を用いて AJ12092 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行って得た DNA 断片を加コニングベクター pHSG398 (TaKaRa 製のマルチクローニングサイトの SmaI 部位に挿入し plasmid p0 を構築した。次に p0 を制限酵素 EcoRV 及び BspHI で消化し、同様に pNEOL-3 及び pNEOL-7 を制限酵素 EcoRV 及び BspHI で消化することによってえられる DNA 断片をライゲーションすることにより変異導入用 plasmid p3 (変異導入用 primer11 由来の変異), 及び p7 (変異導入用 primer13 由来の変異) を得た。

#### 5)変異導入用 plasmid の Arg 生産菌への導入

上記 plasmid を Arg 生産菌 *Bevribacterium lactofermentum* AJ12092 株に導入した。プラスミドの導入は電気パルス法 (特開平 2-207791) を用いた。*Bevribacterium* 中でこれらのプラスミドの自律複製不可能な為、本 plasmid が相同組換えによって染色体に組み込まれた株のみが Cm 耐性株として選択できる。変異導入用 plasmid が染色体に組み込まれた株は 5  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールを含む CM2G プレート培地 (ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 10 g, グルコース 5 g, NaCl 5 g, 寒天 15 g を純水 1 l に含む。pH 7.2) にてクロラムフェニコール耐性株として選択した。次に再度相同組換えをおこして Cm 感受性になった株の中から, argG 遺伝子の promoter 部分が目的の変異配列に置換された株を選択した。

その結果、P3 の配列に置換されたもの(AJ12092-P3),及び P7 の配列に置換されたもの(AJ12092-P7)を得た。

#### 6) argG 遺伝子のクローニング

1) のようにして決定した塩基配列をもとに、配列番号 46 及び 47 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（プライマー 5、6）を合成し、*ブレビバクテリウム・フラバム* 2247 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。PCR 反応は、94°C : 30 秒、55°C : 1 秒、72°C : 2 分 30 秒からなるサイクルを 25 サイクル行った。得られた DNA 断片をクローニングベクター pSTV29（宝酒造（株）製）のマルチクローニングサイト内の SmaI 部位にクローニングし、pSTVarG を作製した。さらに、pSTVarG の SalI 部位に、実施例 1(1) 記載の pSAK4 を SalI 処理して得られた複製起点を含む断片を挿入した pargG を作製した。

#### 7) pargG の Brev.への導入

pargG を *Bevribacterium lactofermentum* AJ12092 株に導入した。プラスミドの導入は電気パルス法（特開平 2-207791）を用いた。形質転換体は 4 µg/ml のクロラムフェニコールを含む CM2G プレート培地（ポリペプトン 10 g、酵母エキス 10 g、グルコース 5 g、NaCl 5 g、寒天 15 g を純水 1 l に含む。pH 7.2）にてクロラムフェニコール耐性株として選択した。

#### 8) promoter 変異株の ArgG 活性

上記 2 種類の ArgG promoter 変異株 及び plasmid にて argG を増幅した株 (AJ12092/pargG) の ArgG 活性を測定した。これらの菌株をグルコース 0.5g/dl, ポリペプトン 1g/dl, 酵母エキス 1g/dl, NaCl 0.5g/dl, クロラムフェニコール 5 µg/l を含む寒天培地にぬりつけ 31.5 度で 20 時間培養して得た菌体 1 E-ゼを、グルコース 3g/dl, 硫酸アモニウム 1.5g/dl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1g/dl, MgSO<sub>4</sub> 0.04g/dl, FeSO<sub>4</sub> 0.001g/dl, MnSO<sub>4</sub> 0.01g/dl, VB<sub>1</sub> 5 µg/dl, biotin 5 µg/dl, 大豆加水分解物 N 量として 45mg/dl を含む培地に植菌し、31.5 度で 18 時間培養して得た菌体を用い、既報 (Journal of General Microbiology (1990), 136, 1177-1183) に従って ArgG 活性の測定をした。上記 2 種類の ArgG promoter 変異株 及び plasmid にて argG を増幅した株 (AJ12092/pargG) の ArgG 活性を表 2 1 に示す。表 2 1 に示

すように、promoter に変異を導入することにより、AJ12092-P3 では親株の約 2 倍に、AJ12092-P7 では約 3 倍に ArgG 活性が上がっていた。また、AJ12092/pargG では ArgG 活性は親株の約 4.5 倍であった。

表 2.1

相対活性 (AJ12092=1)	
AJ12092	1.0
AJ12092-P3	2.1
AJ12092-P7	2.9
AJ12092/pargG	4.4

#### 9) promoter 変異株による Arg 生産

ArgG promoter 変異株のフラスコ培養を行った。対照として親株 AJ12092 及び AJ12092/pargG も同様に培養した。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1g/dl, MgSO<sub>4</sub> 0.04g/dl, FeSO<sub>4</sub> 0.001g/dl, MnSO<sub>4</sub> 0.01g/dl, VB<sub>1</sub> 5μg/dl, biotin 5μg/dl, 大豆加水分解物 N 量として 45mg/dl を含む培地に植菌し、グルコース 0.5g/dl, ポリペプトン 1g/dl, 酵母エキス 1g/dl, NaCl 0.5g/dl, クロラムフェニコール 5μg/l を含む寒天培地にぬりつけ 31.5 度で 20 時間培養して得た菌体 1 E-ゼを、グルコース 4g/dl, 硫酸アンモニウム 6.5g/dl, フラスコにて 31.5 度で グルコースを完全に消費するまで培養した。培養液を 0.2N HCl で 51 倍希釈した液の 620nm での吸光度 (OD 620), アルギニン生成量 (濃度 (g/dl)) 及び培養時間を示した。

表 2.2 に示す様に、argG promoter 変異株では Arg 収率が向上し、plasmid での argG 増幅株と同等の収率であった。また、plasmid 増幅株では培養時間が遅延したのに対し、promoter 変異株では AJ12092-P3, AJ12092-P7 とともに培養時間は親株と同等であり、Arg 生産性が plasmid 増幅株よりも向上することが判った。

表 2 2

	OD	Arg(g/dl)	培養時間 (h)	生産性 (g/dl/h)
AJ12092	0.502	1.25	48	0.026
AJ12092-P3	0.510	1.47	48	0.031
AJ12092-P7	0.514	1.43	48	0.030
AJ12092/pargG	0.520	1.47	52	0.028

実施例 7 : コリネ型グルタミン酸生産菌の GDH 遺伝子プロモーター領域への変異の導入

(1) 変異型 *gdh* プラスミドの構築

上記実施例 2 に示した FGR1 株および FGR2 株がもつ GDH プロモーター配列を有するプラスミドを部位特異的変異手法により構築した。FGR1 株の GDH プロモーター配列を得るためには、配列番号 57 に示す合成 DNA と配列番号 60 に示す合成 DNA をプライマーに用い ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行ない、一方で配列番号 58 に示す合成 DNA と配列番号 59 に示す合成 DNA をプライマーとして用い ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行なった。さらにこの PCR 産物を混合したものを鋳型として配列番号 57 および 58 に示す合成 DNA をプライマーに用い PCR を行なった。こうして得られた PCR 産物を pSFKT2 (特願平 11-69896) の *Sma*I 部位に挿入した pSFKTG11 を構築した。FGR2 株の GDH プロモーター配列を得るためには、配列番号 57 に示す合成 DNA と配列番号 62 に示す合成 DNA をプライマーに用い ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行ない、一方で配列番号 58 に示す合成 DNA と配列番号 61 に示す合成 DNA をプライマーとして用い ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行なった。さらにこの PCR 産物を混合したものを鋳型として配列番号 57 および 58 に示す合成 DNA をプライマーに用い PCR を行なった。こうして得られた PCR 産物を pSFKT2 (特願平 11-

69896) の SmaI 部位に挿入した pSFKTG07 を構築した。なお、pSFKTG11 および pSFKTG07 の SmaI 部位に挿入した DNA 断片の塩基配列決定を行ない、GDH のプロモーター領域以外に変異が導入されていないことを確認している。

#### (2) gdh プロモーター変異株の構築

次に pSFKTG11 および pSFKTG07 を電気パルス法により AJ13029 株に導入し、25°C で 25  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む CM2B プレート上に生育する形質転換体を選択した。この形質転換体を 34°C で培養し、34°C でカナマイシン耐性を示す株を選択した。34°C でカナマイシン耐性を示すことは pSFKTG11 あるいは pSFKTG07 が AJ13029 株の染色体上に組み込まれたことを意味する。このような染色体上にプラスミドが組み込まれた株よりカナマイシン感受性株を取得した。これらの株の GDH プロモーター配列を決定し、pSFKTG11 および pSFKTG07 と同じ gdh プロモーター配列を持つ株をそれぞれ GA01, GA02 とした。

#### (3) gdh プロモーター変異株の L-グルタミン酸生産能の確認

GA01 株、GA02 株およびその親株 AJ13029 株についてグルタミン酸の生産能を上記実施例 2 (2) と同じ方法で確認した。その結果、GA01 および GA02 では顕著なグルタミン酸の蓄積向上が認められた (表 23)。

表 23

菌株	Glu (g/dl)	GDH 比活性	相対値
AJ13029	2.6	7.7	1.0
GA01	3.0	22.3	2.9
GA02	2.9	27.0	3.5

#### (4) セルフクローニング型 gdh プラスミドの構築

まず、セルフクローニングベクター pAJ220 を構築した。pAJ226 (特開昭 61-152289) を EcoRV, PstI で処理し、コリネ型細菌内で自律複製可能な領域を含む断片を調製し、これと pAJ224 (特開昭 61-152289) を EcoRV, PstI で処理して生じるおよそ 0.7kb の DNA 断片とを連結したプラスミドが pAJ220 である。本プラ

スミドはコリネ型菌類内で自律複製可能であり、宿主にトリメトプリム耐性を付与する。

コリネ型細菌野生型の ATCC13869 株の染色体 DNA を鋳型として配列番号 63 および配列番号 64 に示す合成 DNA をプライマーとして PCR 反応を行ない *gdh* 遺伝子断片を調製し、これを pAJ220 の Ball 部位に挿入した pAJ220G を構築した。pAJ220 の Ball 部位近傍にはプロモーターが存在しており、Ball 部位に挿入された遺伝子はその挿入された向きによっては発現量が増強されることとなる。pAJ220G および pGDH を ATCC13869 株に電気パルス法で導入した株を構築し、上記 (1) 記載の方法で GDH 活性を測定した。その結果、pAJ220G 導入株では pGDH 導入株に比しおよそ 1.5 倍の GDH 活性が認められた。(表 24)

表 24

菌株	GDH 比活性	相対値
ATCC13869	7.7	1.0
ATCC13869/pGDH	82.7	10.7
ATCC13869/pAJ220G	120.1	15.6

#### (5) *gdh* 活性が収率および副生 Asp に与える影響の検討

pGDH および pAJ220G を AJ13029 に電気パルス法にて導入した。これらの株と上記 (2) で取得した各株を表 25 に示す組成の種培養培地に接種し、31.5℃に 24 時間

振とう培養して種培養を得た。表 25 に示す組成の本培養培地を 500ml 容ガラス製ジャーファーマンターに 300ml ずつ分注し加熱殺菌した後、上記種培養を 40ml 接種した。攪拌速度を 800 ~ 1300rpm、通気量を 1/2 ~ 1/lvvm とし、培養温度 31.5℃で培養を開始した。培溶液の pH はアンモニアガスで 7.5 に維持した。培養を開始して 8 時間後に 37℃にシフトした。いずれも 20~40 時間でグルコースが完全に消費された時点で培養を終了し、培溶液中に生成蓄積された L-グルタミン酸の量を測定した (表 26)。収率を最高にする GDH 活性は 3 倍程



度であり、それよりも GDH 活性が上昇すると収率向上幅は減少し、およそ 16 倍に強化したところではむしろ収率は低下していた。副生アミノ酸を日立のアミノ酸アナライザー L-8500 にて分析したところ、GDH 活性の上昇に伴いアスパラギン酸およびアラニンの蓄積が上昇していることが明らかとなった。これらの結果から、グルタミン酸収率を向上させるためにはアスパラギン酸およびアラニンの著しい増加を引き起こさないように GDH 活性を適度に強化する必要がある、その方法の一つとして *gdh* プロモーターに各種の変異を導入することで GDH 活性を親株の 3 倍前後に調節することが有効な手段であることが示された。

表 25

成分	濃度			
	種培養		本培養	
グルコース	50	g/l	150	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g/l	2	g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4	g/l	1.5	g/l
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10	mg/l	15	mg/l
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10	mg/l	15	mg/l
大豆蛋白加水分解	20	ml/l	50	ml/l
ビオチン	0.5	mg/l	2	mg/l
サイアミン塩酸塩	2	mg/l	3	mg/l

表 26

菌株	Glu(g/dl)	Asp(mg/dl)	Ala(mg/dl)	GDH 比活性	相対値
AJ 13029	8.3	49	60	7.7	1.0
GA01	9.0	145	152	22.3	2.9
GA02	8.9	153	155	27.0	3.5
AJ13029/pGDH	8.6	201	190	82.7	10.7
AJ13029/pAJ220G	7.5	290	590	120.12	15.6

## 請求の範囲

1. コリネ型細菌の染色体上のアミノ酸又は核酸生合成系遺伝子のプロモーター配列に、コンセンサス配列に近づくような変異を起こさせるか又は遺伝子組換えにより導入して、コリネ型細菌の変異体を調製し、該変異体を培養して目的とするアミノ酸又は核酸の産生量の多い変異体を採取することを特徴とするアミノ酸又は核酸産生能が向上したコリネ型細菌の調製方法。
2. アミノ酸が、グルタミン酸、リジン、アルギニン、セリン、フェニルアラニンからなる群から選ばれ、核酸がイノシン、グアノシン、アデノシン及びヌクレオチドからなる群から選ばれる請求項1記載に方法。
3. アミノ酸が、グルタミン酸であり、そのプロモーターが、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH)、クエン酸合成酵素 (CS)、イソクエン酸合成酵素 (ICDH)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 及びアコニターゼ (ACO) 産生遺伝子用プロモーターからなる群から選ばれる請求項1記載に方法。
4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) 産生遺伝子用プロモーターが、-35領域に CGGTCA、TTGTCA、TTGACA 及び TTGCCA からなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列及び/又は-10領域に TATAAT 配列若しくは該配列の ATAAT の塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものである請求項3記載に方法。
5. GDHのプロモーターが、-35領域として TGGTCA を有し-10領域として TATAAT を有するもの、または、-35領域として TTGTCA を有し-10領域として TATAAT を有するものである請求項4記載の方法。
6. CS用プロモーターが、-35領域に TTGACA 配列及び/又は-10領域に TATAAT 配列を有しており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものである請求項3記載に方法。
7. ICDH用プロモーターが、-35領域の第一又は第二のプロモーターに TTGCCA 配列及び TTGACA 配列のいずれか及び/又は-10領域の第一又は第二のプロモーターに TATAAT 配列を有しており、プロモーター機能を阻害しない

配列を有するものである請求項 3 記載に方法。

8. PDH 用プロモーターが、-35 領域に TTGCCA 配列及び/又は -10 領域に TATAAT 配列を有しており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものである請求項 3 記載に方法。

9. アミノ酸が、アルギニンであり、そのプロモーターが、アルギニノコハク酸シンターゼ用プロモーターである請求項 1 記載に方法。

10. アルギニノコハク酸シンターゼ用プロモーターが、-35 領域に TTGCA、TTGCTA 及び TTGTCA からなる群から選ばれる少なくとも一種の DNA 配列及び/又は -10 領域に TATAAT 配列若しくは該配列の ATAAT の塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するものである請求項 9 記載に方法。

11. アルギニノコハク酸シンターゼ用プロモーターが、-35 領域に TTGCTA 配列及び/又は -10 領域に TATAAT 配列を有するものである請求項 10 記載に方法。

12. 請求項 4 から 8 記載のプロモーターを有するグルタミン酸合成遺伝子。

13. 請求項 10 記載のプロモーターを有するアルギニン合成遺伝子。

14. 請求項 12 記載のグルタミン酸合成遺伝子を有するコリネ型グルタミン酸生産菌。

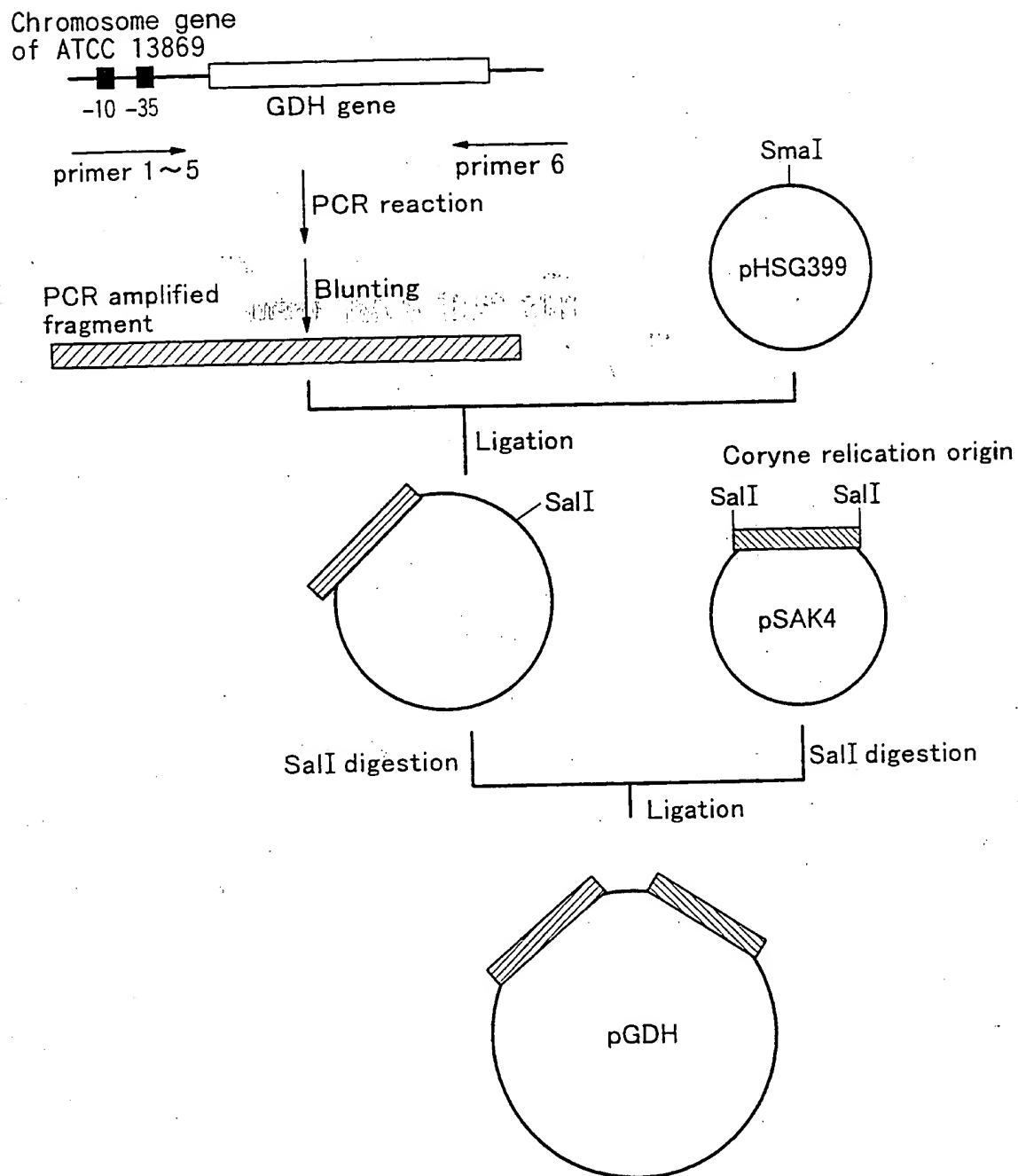
15. 請求項 13 記載のアルギニン合成遺伝子を有するコリネ型アルギニン生産菌。

16. 請求項 1 から 11 の方法で構築したアミノ酸又は核酸産生能が向上したコリネ型細菌、請求項 14 又は 15 のコリネ型細菌を、培地で培養し、培地中に目的のアミノ酸又は核酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを特徴とする発酵法による該アミノ酸又は核酸の製造方法。

17. 4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有するコリネ型 L-グルタミン酸生産菌を、液体培地で培養し、培地中に L-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを特徴とする発酵法による L-グルタミン酸の製造方法。

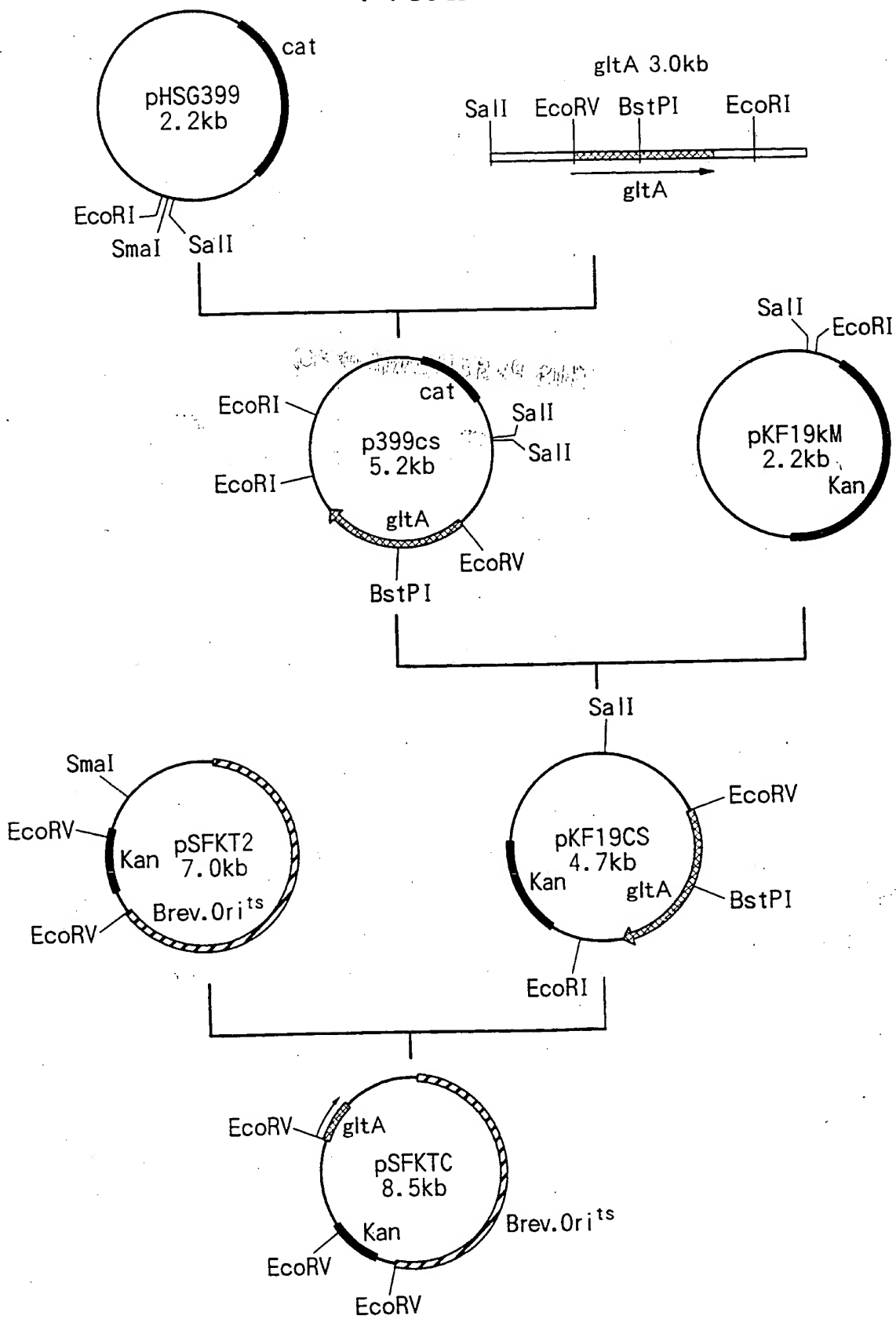
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

FIG. 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

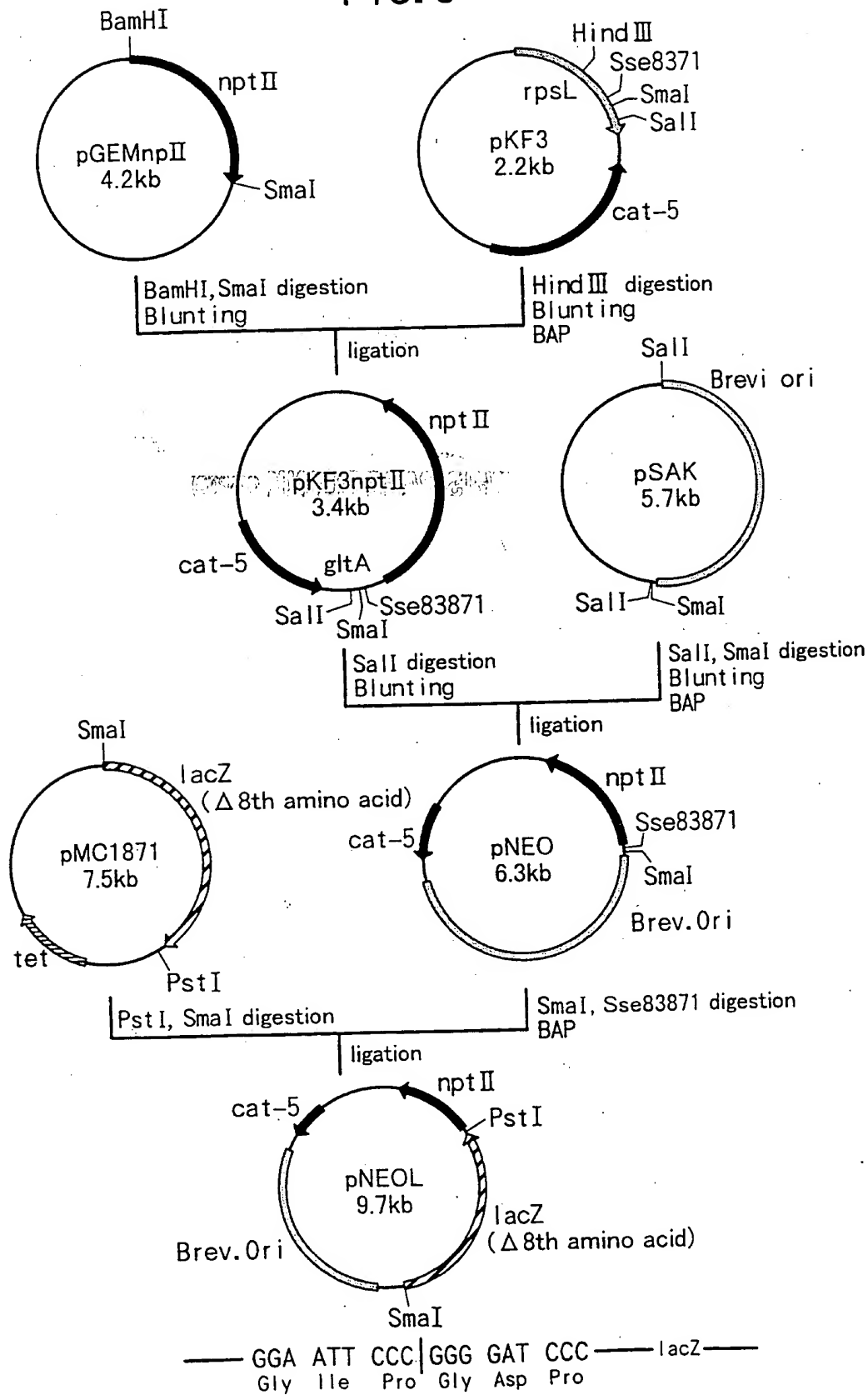
FIG. 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



FIG. 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Sequence Listing

<110> Ajinomoto Co. Inc.

<120> Method of constructing amino acid producing bacteria, and method of preparing amino acids by fermentation with the constructed amino acid producing bacteria

<130> Y1G-0426

<160> 6

<210> 1

<211> 46

<212> nucleic acid

<400> 1

ttaattcttt gtggtcatat ctgcgacact gccataattt gaacgt

<210> 2

<211> 46

<212> nucleic acid

<400> 2

ttaattcttt gcggtcatat ctgcgacact gccataattt gaacgt

<210> 3

<211> 46

<212> nucleic acid

<400> 3

ttaattcttt gtggtcatat ctgcgacact gctataattt gaacgt

<210> 4

<211> 46

<212> nucleic acid

<400> 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ttaattcttt gttgacatat ctgcgacact gctataattt gaacgt

<210> 5

<211> 46

<212> nucleic acid

<400> 5

ttaattcttt gttgccatat ctgcgacact gctataattt gaacgt

<210> 6

<211> 46

<212> nucleic acid

<400> 6

ttaattcttt gttgtcatat ctgcgacact gctataattt gaacgt

<210> 7

<211> 30

<212> nucleic acid

<220> primer A for cloning of gltA from Brevibacterium  
lactofermentum

<400> 7

gtcgacaata gcttgaatct gttctggtcg

<210> 8

<211> 30

<212> nucleic acid

<220> primer B for cloning of gltA from Brevibacterium  
lactofermentum

<400> 8

aagcttatcg acgtcccct cccacccgtt

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 9

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer 1 for introducing a mutation of gltA promoter

<400> 9

atcggtataa cgtgtaacc

<210> 10

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer 2 for introducing a mutation of gltA promoter

<400> 10

atcggtataa tgtgtaacc

<210> 11

<211> 40

<212> nucleic acid

<220> primer 4 for introducing a mutation of gltA promoter

<400> 11

gatttgacaa aaccgcattt atcggtataa tgtgtaacc

<210> 12

<211> 28

<212> nucleic acid

<220> gltA promoter sequence primer

<400> 12

agggatccgt ccagtctcag acagcatc

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<210> 13

<211> 17

<212> nucleic acid

<220> universal primer M13RV

<400> 13

caggaaacag ctatgac

<210> 14

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer A for cloning of ICDH

<400> 14

gaattcgctc ccggtgcagc

<210> 15

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer B for cloning of ICDH

<400> 15

gatgcagaat tccttgctcg

<210> 16

<211> 28

<212> nucleic acid

<220> primer 1 for introducing a mutation of ICD promoter

<400> 16

tggattgctg gctataatgg tgctgtga

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 17

<211> 53

<212> nucleic acid

<220> primer 2 for introducing a mutation of ICD promoter

<400> 17

caaccacgt tcagttgaca actactggat tgctggctat aatgggtgctg tga

<210> 18

<211> 53

<212> nucleic acid

<220> primer 3 for introducing a mutation of ICD promoter

<400> 18

caaccacgt tcagttgact actactggat tgctggctaa agtgggtgctg tga

<210> 19

<211> 28

<212> nucleic acid

<220> primer 4 for introducing a mutation of ICD promoter

<400> 19

ggctgaaact gctataatag gcgccagc

<210> 20

<211> 51

<212> nucleic acid

<220> primer 5 for introducing a mutation of ICD promoter

<400> 20

ggaaacacgg cggttgccatg cggggctgaa actgctataa taggcgccag c

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 21

<211> 51

<212> nucleic acid

<220> primer 6 for introducing a mutation of ICD promoter

<400> 21

ggaaacacgg cggtgacatg cggggctgaa actgctataa taggcgccag c

<210> 22

<211> 22

<212> nucleic acid

<220> ICD promoter sequence primer

<400> 22

gtgcgggtcc agatgatctt ag

<210> 23

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer A for amplifying of nptII

<400> 23

gggatcccg atgaatgtca

<400> 24

<211> 23

<212> nucleic acid

<220> primer B for amplifying of nptII

<400> 24

gcccggggtg ggcgaagaac tcc

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 25

<211> 23

<212> nucleic acid

<220> primer for amplifying of *Brevibacterium lactofermentum pdhA gene LA*

<400> 25

aci gti tci atg ggi cti ggi cc

<210> 26

<211> 23

<212> nucleic acid

<220> primer for amplifying of *Brevibacterium lactofermentum pdhA gene LA*

<400> 26

cct tci ccg tti agi gti gti cg

<210> 27

<211> 30

<212> nucleic acid

<220> primer for in vitro cloning of *Brevibacterium lactofermentum pdhA gene LA*

<400> 27

ttg cag tta acc acg aag gtc agg ttg tcc

<210> 28

<211> 30

<212> nucleic acid

<220> primer for in vitro cloning of *Brevibacterium lactofermentum pdhA gene LA*

<400> 28

tgg atg aga cca cgt gat tet ggc tgc tcc

<210> 29

<211> 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<212> nucleic acid

<220> primer for *in vitro* cloning of *Brevibacterium lactofermentum pdhA gene LA*

<400> 29

aca gat cct gca cga agg cat caa cga ggc

<210> 30

<211> 30

<212> nucleic acid

<220> primer for *in vitro* cloning of *Brevibacterium lactofermentum pdhA gene LA*

<400>

tca tcg ctg cgg gta cct cct acg cca ccc

<210> 31

<211> 2766

<212> nucleic acid

<213> *Brevibacterium lactofermentum ATCC13869*

<220> *Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 pdhA gene LA*

<400> 31

atg gcc gat caa gca aaa ctt ggt ggt aag ccc tcg gat gac tct aac 48

Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn

1

5

10

15

ttc gcg atg atc cgc gat ggc gtg gca tct tat ttg aac gac tca gat 96

Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp

20

25

30

ccg gag gag acc aac gag tgg atg gat tca ctc gac gga tta ctc cag 144

Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

35 40 45  
 gag tot tot cca gaa cgt gct cgt tac ctc atg ctt cgt ttg ctt gag 192  
 Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu  
 50 55 60  
 cgt gca tct gca aag cgc gta tct ctt ccc cca atg acg tca acc gac 240  
 Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp  
 65 70 75 80  
 tac gtc aac acc att cca acc tct atg gaa cct gaa ttc cca ggc gat 288  
 Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp  
 85 90 95  
 gag gaa atg gag aag cgt tac cgt cgt tgg att cgc tgg aac gca gcc 336  
 Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala  
 100 105 110  
 atc atg gtt cac cgc gct cag cga cca ggc atc ggc gtc ggc gga cac 384  
 Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His  
 115 120 125  
 att tcc act tac gca ggc gca gcc cct ctg tac gaa gtt ggc ttc aac 432  
 Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn  
 130 135 140  
 cac ttc ttc cgc ggc aag gat cac cca ggc ggc ggc gac cag atc ttc 480  
 His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

145                                      150                                      155                                      160

ttc cag ggc cac gca tca cca ggt atg tac gca cgt gca ttc atg gag 528  
Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu

                                    165                                      170                                      175

ggg cgc ctt tct gaa gac gat ctc gat ggc ttc cgt cag gaa gtt tcc 576  
Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser

                                    180                                      185                                      190

cgt gag cag ggt ggc att ccg tcc tac cgt cac cca cac ggt atg aag 624  
Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys

                                    195                                      200                                      205

gac ttc tgg gag ttc cca act gtg tcc atg ggt ctt ggc cca atg gat 672  
Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp

                                    210                                      215                                      220

gcc att tac cag gca cgt ttc aac cgc tac ctc gaa aac cgt ggc atc 720  
Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile

225                                      230                                      235                                      240

aag gac acc tct gac cag cac gtc tgg gcc ttc ctt ggc gac ggc gaa 768  
Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu

                                    245                                      250                                      255

atg gac gag cca gaa tca cgt ggt ctc atc cag cag gct gca ctg aac 816  
Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

260 265 270  
aac ctg gac aac ctg acc ttc gtg gtt aac tgc aac ctg cag cgt ctc 864  
Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu  
275 280 285  
gac gga cct gtc cgc ggt aac acc aag atc atc cag gaa ctc gag tcc 912  
Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile Gln Glu Leu Glu Ser  
290 295 300  
ttc ttc cgt ggc gca ggc tgg tct gtg atc aag gtt gtt tgg ggt cgc 960  
Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys Val Val Trp Gly Arg  
305 310 315 320  
gag tgg gat gaa ctt ctg gag aag gac cag gat ggt gca ctt gtt gag 1008  
Glu Trp Asp Glu Leu Leu Glu Lys Asp Gln Asp Gly Ala Leu Val Glu  
325 330 335  
atc atg aac aac acc tcc gat ggt gac tac cag acc ttc aag gct aac 1056  
Ile Met Asn Asn Thr Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Asn  
340 345 350  
gac ggc gca tat gtt cgt gag cac ttc ttc gga cgt gac cca cgc acc 1104  
Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly Arg Asp Pro Arg Thr  
355 360 365  
gca aag ctc gtt gag aac atg acc gac gaa gaa atc tgg aag ctg cca 1152  
Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu Ile Trp Lys Leu Pro  
370 375 380

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



cgt ggc ggc cac gat tac cgc aag gtt tac gca gcc tac aag cga gct 1200

Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala

385

390

395

400

ctt gag acc aag gat cgc cca acc gtc atc ctt gct cac acc att aag 1248

Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys

405

410

415

ggc tac gga ctc ggc cac aac ttc gaa ggc cgt aac gca acc cac cag 1296

Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Gln

420

425

430

atg aag aag ctg acg ctt gat gat ctg aag ttg ttc cgc gac aag cag 1344

Met Lys Lys Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln

435

440

445

ggc atc cca atc acc gat gag cag ctg gag aag gat cct tac ctt cct 1392

Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro

450

455

460

cct tac tac cac cca ggt gaa gac gct cct gaa atc aag tac atg aag 1440

Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys

465

470

475

480

gaa cgt cgc gca gcg ctc ggt ggc tac ctg cca gag cgt cgt gag aac 1488

Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn

485

490

495

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

TAC GAT CCA ATT CAG GTT CCA CCA CTG GAT AAG CTT CGC TCT GTC CGT 1536

Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg

500

505

510

aag ggc tcc ggc aag cag cag atc gct acc act atg gcg act gtt cgt 1584

Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg

515

520

525

acc ttc aag gaa ctg atg cgc gat aag ggc ttg gct gat cgc ctt gtc 1632

Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val

530

535

540

cca atc att cct gat gag gca cgt acc ttc ggt ctt gac tct tgg ttc 1680

Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe

545

550

555

560

cca acc ttg aag atc tac aac ccg cac ggt cag aac tac gtg cct gtt 1728

Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val

565

570

575

gac cac gac ctg atg ctc tcc tac cgt gag gca cct gaa gga cag atc 1776

Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile

580

585

590

ctg cac gaa ggc atc aac gag gct ggt tcc gtg gca tcg ttc atc gct 1824

Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Val Ala Ser Phe Ile Ala

595

600

605

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

gcg ggt acc tcc tac gcc acc cac ggc aag gcc atg att ccg ctg tac 1872

Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr

610

615

620

atc ttc tac tcg atg ttc gga ttc cag cgc acc ggt gac tcc atc tgg 1920

Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp

625

630

635

640

gca gca gcc gat cag atg gca cgt ggc ttc ctc ttg ggc gct acc gca 1968

Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala

645

650

655

ggt cgc acc acc ctg acc ggt gaa ggc ctc cag cac atg gat gga cac 2016

Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His

660

665

670

tcc cct gtc ttg gct tcc acc aac gag ggt gtc gag acc tac gac cca 2064

Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro

675

680

685

tcc ttt gcg tac gag atc gca cac ctg gtt cac cgt ggc atc gac cgc 2112

Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His Arg Gly Ile Asp Arg

690

695

700

atg tac ggc cca ggc aag ggt gaa gat gtt atc tac tac atc acc atc 2160

Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile Tyr Tyr Ile Thr Ile

705

710

715

720

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

tac aac gag cca acc cca cag cca gct gag cca gaa gga ctg gac gta 2208

Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro Glu Gly Leu Asp Val

725

730

735

gaa ggc ctg cac aag ggc atc tac ctc tac tcc cgc ggt gaa ggc acc 2256

Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Arg Gly Glu Gly Thr

740

745

750

ggc cat gag gca aac atc ttg gct tcc ggt gtt ggt atg cag tgg gct 2304

Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val Gly Met Gln Trp Ala

755

760

765

ctc aag gct gca tcc atc ctt gag gct gac tac gga gtt cgt gcc aac 2352

Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr Gly Val Arg Ala Asn

770

775

780

att tac tcc gct act tct tgg gtt aac ttg gct cgc gat ggc gct gct 2400

Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala Arg Asp Gly Ala Ala

785

790

795

800

cgt aac aag gca cag ctg cgc aac cca ggt gca gat gct ggc gag gca 2448

Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala Asp Ala Gly Glu Ala

805

810

815

ttc gta acc acc cag ctg aag cag acc tcc ggc cca tac gtt gca gtg 2496

Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly Pro Tyr Val Ala Val

820

825

830

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



tct gac ttc tcc act gat ctg cca aac cag atc cgt gaa tgg gtc cca 2544

Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile Arg Glu Trp Val Pro

835

840

845

ggc gac tac acc gtt ctc ggt gca gat ggc ttc ggt ttc tct gat acc 2592

Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe Gly Phe Ser Asp Thr

850

855

860

cgc cca gct gct cgt cgc ttc ttc aac atc gac gct gag tcc att gtt 2640

Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp Ala Glu Ser Ile Val

865

870

875

880

gtt gca gtg ctg aac tcc ctg gca cgc gaa ggc aag atc gac gtc tcc 2688

Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly Lys Ile Asp Val Ser

885

890

895

gtt gct gct cag gct gct gag aag ttc aag ttg gat gat cct acg agt 2736

Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu Asp Asp Pro Thr Ser

900

905

910

gtt tcc gta gat cca aac gct cct gag gaa

2766

Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 8556

&lt;212&gt; nucleic acid

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum ATCC13869

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;400&gt; 32

tcacgttacg gcgatcaaca ccgaaccac tacgagaaga tctccaaacg agaccaagag	60
cgcttctaaag cccgtctcat ttgacactg ccattctgtg aggatatggc aggtgctttt	120
tcattgccact atcttggggt tctcggtatt agatcttctg ataaaaaccc gatagttttc	180
ttgcgctaga cactaattac ggcaccgctt aagcatggtc gtgacacgta aaacctgact	240
taggccattt tgatgtgggt tagatcatat tgacgtcaat gaatgaagtg actaactccg	300
ccgaatccac atcgtctaaa aggcctgggc gaccacgtaa agacggggac gacgagaaga	360
tcacgcacgc aactttacgg ctcacgcaca gcaatcgctc cgtcacggtc aatgcagttg	420
tcaaagaaag cggagtggca cgtgcagcgg tttatcgacg ctggcccagg ctagtggatc	480
tagtagcggg agcttttagat gccgggcgag ctccagttga aatagatacc ccaggggaca	540
tcaaagagac cttgattgat gggctgttta caaatcaggc gaaaaccact ggagtctcct	600
atcctcgta cgcatttcgc aaacggctcg agttgggtg gtcagatcaa gaattacagc	660
tcgcctaata gaattcacat gtgaagagac gtcgagaagc aaatattcgc gcgctgcaag	720
tcgcgcaaga aaaaggccaa atccgggcgg atctagacat cgaggcgtgc ctgatgcaa	780
tccttggggt gttttattac caatcggctc gcgctggagt aaatttcacc gaccaaggta	840
caacgcaacg atgcagagaa gccttgagg tgatctggca tggaatggaa ccttaaattc	900
aggttctgac gaggtgcgaa gcaagttgtc gcgcgcgcga cctcagtatc cggatcaact	960
taatttcgaa gtgctgggtt ttctcgcgca tacccaatgc gtaccgatgt gccatgagc	1020
gaaaaacagg ccacgataag tttcttaaaa cttatcgtgg cctgcttcta tatttgtcg	1080
ccctgacggg ctggaaccgc cgacctgctg ggtgtaaacc agctgtcttt ccagctgagc	1140
taaaggcgcg cacgtgcttt tctagaacca ctttggtggc ctgaaaagca acgagtga	1200
tactaacaca caatctccac agacctaaaa tcgctgctca ggccgtggaa attagcgatt	1260
gttaaggctt cttgtttcca cgctggacga ggcaagaacc ttgccaatta ccgagacgtt	1320
ccgccttggc ctgcacgaga cctgccagtt gtgctgattc agagataact ccaggagcca	1380
gggctccttc ttaccaatg ccaggagtca acaccagat acgaccattc tcagcgaggg	1440
agcggtatga atccacaagt ccgtcgacga gatcgccgtc atcctcgcgc caccagagca	1500
gcacgacatc gcacagctcg tcggtttctt catcgagtag ttcttcaccg attgcatctt	1560
cgatggactc gctgatecgc gtgtcggaat cttcatccca tccaatttct tgaacgatat	1620
gacccgattg aatgccgagt agttgagcat aatcctgggc accttgcttg actgcgccg	1680
gagcgtcggc cactttaata atcctcctcg tgtgggcccc gatgtgtttt tcgattacat	1740

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ggattcaaca tgaaccgcg gggctattga tatatccgaa ttgcacatta ccgtccaacc 1800  
 ggtactttga accacctttc cctggaattt tttccttttc ctcccccttt acgctcaaga 1860  
 atcaatgaat tcaatcactg gccagcgatt aacttttcga gttttcagtc ttggatttcc 1920  
 acaattctct tcaaaataat ggtggctaga tttttcatca aacctcacc aaaaggacat 1980  
 cagacctgta gttttatgcg attcgcgtca aacgtgagag aaacatcaca tctcacggga 2040  
 aactaccgga taattctttg caaaactttg caaagggtaa tgaacatgca gctagtttcc 2100  
 gtagaaatgt tctttaaaaa atccacaaca attgccagga agcacaccga ttgatggata 2160  
 cctgaaatcc cagtgagegc accactcccc ttacgtcaca gtctgtaaaa caaatcttcg 2220  
 gtgttgcgta tccttgtaa taacttatgc gttgacccat tcgtgcactt cgggtgtgcca 2280  
 caattaggta cgaccaagaa tgggaccggg aaaccgggac gtataaacga aataaaacat 2340  
 tccaacagga ggtgtggaa atg gcc gat caa gca aaa ctt ggt ggt aag ccc 2392

Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro

5

10

tcg gat gac tct aac ttc gcg atg atc cgc gat ggc gtg gca tct tat 2440  
 Ser Asp Asp Ser Asn Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr

15

20

25

ttg aac gac tca gat ccg gag gag acc aac gag tgg atg gat tca etc 2488  
 Leu Asn Asp Ser Asp Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu

30

35

40

gac gga tta etc cag gag tct tct cca gaa cgt gct cgt tac etc atg 2536  
 Asp Gly Leu Leu Gln Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met

45

50

55

ctt cgt ttg ctt gag cgt gca tct gca aag cgc gta tct ctt ccc cca 2584  
 Leu Arg Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro

60

65

70

75

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

atg acg tca acc gac tac gtc aac acc att cca acc tct atg gaa cct 2632

Met Thr Ser Thr Asp Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro

80

85

90

gaa ttc cca ggc gat gag gaa atg gag aag cgt tac cgt cgt tgg att 2680

Glu Phe Pro Gly Asp Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile

95

100

105

cgc tgg aac gca gcc atc atg gtt cac cgc gct cag cga cca ggc atc 2728

Arg Trp Asn Ala Ala Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile

110

115

120

ggc gtc ggc gga cac att tcc act tac gca ggc gca gcc cct ctg tac 2776

Gly Val Gly Gly His Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr

125

130

135

gaa gtt ggc ttc aac cac ttc ttc cgc ggc aag gat cac cca ggc ggc 2824

Glu Val Gly Phe Asn His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly

140

145

150

155

ggc gac cag atc ttc ttc cag ggc cac gca tca cca ggt atg tac gca 2872

Gly Asp Gln Ile Phe Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala

160

165

170

cgt gca ttc atg gag ggt cgc ctt tct gaa gac gat ctc gat ggc ttc 2920

Arg Ala Phe Met Glu Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe

175

180

185

cgt cag gaa gtt tcc cgt gag cag ggt ggc att ccg tcc tac cct cac 2968

Arg Gln Glu Val Ser Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



190	195	200	
cca cac ggt atg aag gac ttc tgg gag ttc cca act gtg tcc atg ggt			3016
Pro His Gly Met Lys Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly			
205	210	215	
ctt ggc cca atg gat gcc att tac cag gca cgt ttc aac cgc tac ctc			3064
Leu Gly Pro Met Asp Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu			
220	225	230	235
gaa aac cgt ggc atc aag gac acc tct gac cag cac gtc tgg gcc ttc			3112
Glu Asn Arg Gly Ile Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe			
240	245	250	
ctt ggc gac ggc gaa atg gac gag cca gaa tca cgt ggt ctc atc cag			3160
Leu Gly Asp Gly Glu Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln			
255	260	265	
cag gct gca ctg aac aac ctg gac aac ctg acc ttc gtg gtt aac tgc			3208
Gln Ala Ala Leu Asn Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys			
270	275	280	
aac ctg cag cgt ctc gac gga cct gtc cgc ggt aac acc aag atc atc			3256
Asn Leu Gln Arg Leu Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile			
285	290	295	
cag gaa ctc gag tcc ttc ttc cgt ggc gca ggc tgg tct gtg atc aag			3304
Gln Glu Leu Glu Ser Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys			
300	305	310	315

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

gtt gtt tgg ggt cgc gag tgg gat gaa ctt ctg gag aag gac cag gat 3352

Val Val Trp Gly Arg Glu Trp Asp Glu Leu Leu Glu Lys Asp Gln Asp

320

325

330

ggt gca ctt gtt gag atc atg aac aac acc tcc gat ggt gac tac cag 3400

Gly Ala Leu Val Glu Ile Met Asn Asn Thr Ser Asp Gly Asp Tyr Gln

335

340

345

acc ttc aag gct aac gac ggc gca tat gtt cgt gag cac ttc ttc gga 3448

Thr Phe Lys Ala Asn Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly

350

355

360

cgt gac cca cgc acc gca aag ctc gtt gag aac atg acc gac gaa gaa 3496

Arg Asp Pro Arg Thr Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu

365

370

375

atc tgg aag ctg cca cgt ggc ggc cac gat tac cgc aag gtt tac gca 3544

Ile Trp Lys Leu Pro Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala

380

385

390

395

gcc tac aag cga gct ctt gag acc aag gat cgc cca acc gtc atc ctt 3592

Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu

400

405

410

gct cac acc att aag ggc tac gga ctc ggc cac aac ttc gaa ggc cgt 3640

Ala His Thr Ile Lys Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg

415

420

425

aac gca acc cac cag atg aag aag ctg acg ctt gat gat ctg aag ttg 3688

Asn Ala Thr His Gln Met Lys Lys Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

430	435	440	
ttc cgc gac aag cag ggc atc cca atc acc gat gag cag ctg gag aag			3736
Phe Arg Asp Lys Gln Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys			
445	450	455	
gat cct tac ctt cct cct tac tac cac cca ggt gaa gac gct cct gaa			3784
Asp Pro Tyr Leu Pro Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu			
460	465	470	475
atc aag tac atg aag gaa cgt cgc gca gcg ctc ggt ggc tac ctg cca			3832
Ile Lys Tyr Met Lys Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro			
480	485	490	
gag cgt cgt gag aac tac gat cca att cag gtt cca cca ctg gat aag			3880
Glu Arg Arg Glu Asn Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys			
495	500	505	
ctt cgc tct gtc cgt aag ggc tcc ggc aag cag cag atc gct acc act			3928
Leu Arg Ser Val Arg Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr			
510	515	520	
atg gcg act gtt cgt acc ttc aag gaa ctg atg cgc gat aag ggc ttg			3976
Met Ala Thr Val Arg Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu			
525	530	535	
gct gat cgc ctt gtc cca atc att cct gat gag gca cgt acc ttc ggt			4024
Ala Asp Arg Leu Val Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly			
540	545	550	555

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ctt gac tct tgg ttc cca acc ttg aag atc tac aac ccg cac ggt cag 4072

Leu Asp Ser Trp Phe Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln

560

565

570

aac tac gtg cct gtt gac cac gac ctg atg ctc tcc tac cgt gag gca 4120

Asn Tyr Val Pro Val Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala

575

580

585

cct gaa gga cag atc ctg cac gaa ggc atc aac gag gct ggt tcc gtg 4168

Pro Glu Gly Gln Ile Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Val

590

595

600

gca tcg ttc atc gct gcg ggt acc tcc tac gcc acc cac gcc aag gcc 4216

Ala Ser Phe Ile Ala Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala

605

610

615

atg att ccg ctg tac atc ttc tac tcg atg ttc gga ttc cag cgc acc 4264

Met Ile Pro Leu Tyr Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr

620

625

630

635

ggt gac tcc atc tgg gca gca gcc gat cag atg gca cgt gcc ttc ctc 4312

Gly Asp Ser Ile Trp Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu

640

645

650

ttg ggc gct acc gca ggt cgc acc acc ctg acc ggt gaa ggc ctc cag 4360

Leu Gly Ala Thr Ala Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln

655

660

665

cac atg gat gga cac tcc cct gtc ttg gct tcc acc aac gag ggt gtc 4408

His Met Asp Gly His Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



670	675	680	
gag acc tac gac cca tcc ttt gcg tac gag atc gca cac ctg gtt cac			4456
Glu Thr Tyr Asp Pro Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His			
685	690	695	
cgt ggc atc gac cgc atg tac ggc cca ggc aag ggt gaa gat gtt atc			4504
Arg Gly Ile Asp Arg Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile			
700	705	710	715
tac tac atc acc atc tac aac gag cca acc cca cag cca gct gag cca			4552
Tyr Tyr Ile Thr Ile Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro			
720	725	730	
gaa gga ctg gac gta gaa ggc ctg cac aag ggc atc tac ctc tac tcc			4600
Glu Gly Leu Asp Val Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser			
735	740	745	
cgc ggt gaa ggc acc ggc cat gag gca aac atc ttg gct tcc ggt gtt			4648
Arg Gly Glu Gly Thr Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val			
750	755	760	
ggt atg cag tgg gct ctc aag gct gca tcc atc ctt gag gct gac tac			4696
Gly Met Gln Trp Ala Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr			
765	770	775	
gga gtt cgt gcc aac att tac tcc gct act tct tgg gtt aac ttg gct			4744
Gly Val Arg Ala Asn Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala			
780	785	790	795

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cgc gat ggc gct gct cgt aac aag gca cag ctg cgc aac cca ggt gca 4792

Arg Asp Gly Ala Ala Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala

800

805

810

gat gct ggc gag gca ttc gta acc acc cag ctg aag cag acc tcc ggc 4840

Asp Ala Gly Glu Ala Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly

815

820

825

cca tac gtt gca gtg tct gac ttc tcc act gat ctg cca aac cag atc 4888

Pro Tyr Val Ala Val Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile

830

835

840

cgt gaa tgg gtc cca ggc gac tac acc gtt ctc ggt gca gat ggc ttc 4936

Arg Glu Trp Val Pro Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe

845

850

855

ggt ttc tct gat acc cgc cca gct gct cgt cgc ttc ttc aac atc gac 4984

Gly Phe Ser Asp Thr Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp

860

865

870

875

gct gag tcc att gtt gtt gca gtg ctg aac tcc ctg gca cgc gaa ggc 5032

Ala Glu Ser Ile Val Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly

880

885

890

aag atc gac gtc tcc gtt gct gct cag gct gct gag aag ttc aag ttg 5080

Lys Ile Asp Val Ser Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu

895

900

905

gat gat cct acg agt gtt tcc gta gat cca aac gct cct gag gaa taaat 5130

Asp Asp Pro Thr Ser Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

910	915	920	
cacctcaagg gacagataaa tcccgcgcgc agacgttagt ctggcggcgg gattcgtcgt			5190
aaagcaagct ctttttagcc gagaaacgcc ttgtcagaca atgttgcgcc cttgatattg			5250
gcgaactcct gcagcaaata gcgcacagtc aacttcgact tggtagcctg atctgcctgg			5310
tagacaatct ggcccttcag catcatgata aggcgattgc ccaggcgaat tgccctgttc			5370
atgttgtgcg tgaccataag cgtagtcaga gttccatctg ccacgatctt ttccgtcaag			5430
gtggtcacaa gctctgcacg ctgtggatca agcgtgcgg tgtgctcgc caacagcatg			5490
attttaggtt gagtaaaacc agccatcagc agggacaatg cctgacgctg accgccagag			5550
agcaaacc aa ctttggcagt gagcctgttt tccagaccca gctcaaggcg ctcaagttcc			5610
tgcttgaatt gctcacggcg cttcagagtc agtgcaaaag ccaatccacg gcgcttgccg			5670
cgcagcaacg cgatggccag attctcttca atgggtgagat tcggcgcggg gcttgccaaa			5730
ggatcctgaa aaacgcggcc gatgtagcgg gcacgcttgt gctctgacat cttgtttacc			5790
ttgttgccgt cgatggaaat ctgcgcggaa tcaacaagca aacggccaga aacagcgttg			5850
agcaggggtg atttaccgc accgttagaa ccgatgacgg tgacaaaata gccctcagcc			5910
atctcgagtt tgagctgctg caacgcgcgg cgctcattca cagtgcgggg gaagaaggtt			5970
ttggaaatc cgttgatgga taacatgtct taagcctcca ctgctactgg ttgcttaggc			6030
ttcgggtgct tggagaactt cgcacgccac ctgcgcagca gcatggcgac aaccaccaag			6090
atcgcagaaa ttgccttcac atcgttgggg tcaaggccaa cgcgcagtcg tgcgaaaatg			6150
atcaggcggg acgcgatggc accgacgatg acagccaaca cagccaacca cagcgcagcg			6210
tgaccgaaga tggcctggcc ccaaaataac cgatgcgaga ccgatcacga tgaggccaat			6270
accatcgaa atatctgca agccctggta ctgagcgatg agtgcaccgg caagaccaac			6330
agaaccattg gacagggaga tgggtaggat ttggtgaaa tccgttgaaa caccaaagga			6390
ctgcaccatc ggcccgttgt cgcgggtgga tcgcagcgac agtccgatat cagtgttgag			6450
gaaccagatg acgatgagtc ccaaaaatcc cactgcaacg gcgaggatcg ccgggcctgc			6510
ccatgtgccg agggagccgg cgtcgcgaag cggggtgaag aggttatcgg tgcgcaacaa			6570
tggcacgttc gcgccacca tgatgcgcaa gttaccgac cacaacgcaa tcatggtcaa			6630
aatacctgcg agcaaaccat cgatcttgcc cttggtgtgc agcaaaccgg tgatcatgcc			6690
agcgataaag ccagtaacga aaccagcggc agtagccata agaggaggcc agccagacat			6750
aagagctgtc gcagctgttg ccgcgccagt ggtcaggctg ccgtcaacgg tgaggtcggg			6810

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

aaagttgagc acacggaacg tcaaatagac gcccaatgcg acaactccgt acaacaatcc 6870  
 gaactcaaaa gcgcgatca tacgcgttcg gccttatcca aaatctcttg agggatctcc 6930  
 acgccctggc gctctgctgc atcttcgttg atcacgtagg tgaactcagt tgcagtctcc 6990  
 acaggcatgg ttgctgggtc ttccgcgtcc tgcagaatac gcagagccat ctccgcagtc 7050  
 tggcggccaa gctcgggtga atcgataccc agggttgcc a gtgcgccacc ctcaacagtg 7110  
 ccggactcag caccgatcac agggatctgc ttctgctcag caacctgaac cagagaagaa 7170  
 ataccgaaa caaccatggt gtcagttgga acgtagatga catcaacatc gccgagagct 7230  
 tcaacagcct gctgaatctc gttcacggta gtgacagtct gagtattaac ggacagcccc 7290  
 agtggctcag cagccttggt gacctcatcg acctgcacct gagagttgac ctccaccagac 7350  
 gcgtagacga tgcgatgga ctttgcgtca ggaaccagct gctgcaaaag ctccaactgc 7410  
 tgctcaatcg gtgcgatatc agaagtaccg gtgacgtttc cgccaggtgc ttcattagaa 7470  
 tccaccagct ctgccgacac tgcacggta actgcggtga acaggactgg gatatcagtg 7530  
 atattctgcg cagttgcctg tgcgtctgga gttgcaacag ccaacacgag atccaaattg 7590  
 tcagaagcga actgctgaga aatagtcagt gcagtgcctt gctcgcggtt agcgttttgc 7650  
 tcatcaaagg tgacgtcaac gcctgcctct tcaaaagctt ccttgaaacc agtggctcgt 7710  
 gcatcaagtg caggggtgctg aacaagctgg ttgatgccaa ctccgtaaga gtcgccacct 7770  
 gcagcatcag tggaggtgga gctgtcactg gaatcgcttg agcacgaagc caacgccaa 7830  
 gcgccaacag taaagatgct tgcgagtacc ttccgaacggg aagaaaacat agcacatctc 7890  
 cttaaagtgt tattttcaaa aaggggcaga cagcgtcaac acatgtctcg gataaagaac 7950  
 catatgtgaa atgtctcatg atttaacta cttgtttac cagtcatatg cgcaattccc 8010  
 cctggatatc ccgcaggaca tggacaaaat ggggtgatag cgggtgcacc aattcaatct 8070  
 tttaaaggcc ctagacaccg cgatttcctt aatcgatcat taaagaggga tcctctcccc 8130  
 taacaaacct ccaaagacta gagtggggaa caccatgaac gtttcctcaa ataaaccag 8190  
 tgactctgac cgcgaatc tcaatcaga actcaccggc ctccgttgcc aggggcgact 8250  
 cgatctagat acttaccag acgtgggtga taccgtttgg tctactgatg atctaggcga 8310  
 gttgatgagg atccgtgccc gcttcctggg agggccgcag gtttcgcagc agcggcccca 8370  
 gcagccgcag caaccacatc agcggccgca acagcaaccg ccacagcatt atggacaacc 8430  
 cggtacggc caatcacctc aatatccacc gcagcagcct ccgcataatc agcccggcta 8490  
 ttaccccgat cccggccctg gccagcagca accaccgatg caccagccac caacgcgtcc 8550  
 aaatca

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<210> 33

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer for construction of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene LA  
amplification plasmid

<400> 33

aat gcc agg agt caa cac cc

<210> 34

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer for construction of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene LA  
amplification plasmid

<400> 34

aca tgg aac agg caa ttc gc

<210> 35

<211> 28

<212> nucleic acid

<220> primer for introducing a mutation of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene  
LA promoter

<400> 35

cgt ccc ggg ctg taa aac aaa tct tcg g

<210> 36

<211> 27

<212> nucleic acid

<220> primer for introducing a mutation of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene  
LA promoter

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<400> 36

atc ccc ggg ctt acc acc aag ttt tgc

<210> 37

<211> 30

<212> nucleic acid

<220> primer for introducing a mutation of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene

LA promoter

<400> 37

ctt atg cgt tgc cac att cgt gca ctt egg

<210> 38

<211> 40

<212> nucleic acid

<220> primer for introducing a mutation of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene

LA promoter

<400> 38

gcg ttg acc cat tcg tgc act tcg gtg tgc tat aat tag g

<210> 39

<211> 40

<212> nucleic acid

<220> primer for introducing a mutation of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene

LA promoter

<400> 39

gcg ttg cca cat tcg tgc act tcg gtg tgc tat aat tag g

<210> 40

<211> 38

<212> nucleic acid

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<220> primer for introducing a mutation of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene  
LA promoter

<400> 40

ttt taa aac gtt ctg gag aag act cct gga gta atc cg

<210> 41

<211> 20

<212> nucleic acid

<220> primer for introducing a mutation of *Brevibacterium lactofermentum* pdhA gene  
LA promoter

<400> 41

cga tct tgc ctt cgc gtg cc

<210> 42

<211> 30

<212> nucleic acid

<400> 42

agaccgcgag agtatgcaag aacgatgcgg

<210> 43

<211> 30

<212> nucleic acid

<400> 43

gacttcacca tcaatcatct tcttcaggta

<210> 44

<211> 30

<212> nucleic acid

<400> 44

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

accttcgacc agaccctggc taagggttt

<210> 45

<211> 30

<212> nucleic acid

<400> 45

gctaacaagc gcgatcgca agctggcaac

<210> 46

<211> 25

<212> nucleic acid

<400> 46

gcgatgacac cgtttttggt ctgc

<210> 47

<211> 25

<212> nucleic acid

<400> 47

ggcgacatcc ttgccagat gatca

<210> 48

<211> 25

<212> nucleic acid

<400> 48

gacttcacca tcaatcatct tcttc

<210> 49

<211> 24

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<212> nucleic acid

<400> 49

gccagggtaca actgtctgaa ttgc

<210> 50

<211> 40

<212> nucleic acid

<220> primer for introducing a mutation

<400> 50

gttaatcgct tgccaatgca ggcaggtaag gtataacccg

<210> 51

<211> 40

<212> nucleic acid

<400> 51

gttaatcgct tgctaatagca ggcaggtaag gtataacccg

<210> 52

<211> 40

<212> nucleic acid

<400> 52

gttaatcgct tgtcaatgca ggcaggtaag gtataacccg

<210> 53

<211> 40

<212> nucleic acid

<400> 53

gttaatcgct tgtaatagca ggcaggtaag gtataatccg

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 54

<211> 40

<212> nucleic acid

<400> 54

gttaatcgct tgtcaatgca ggcaggtaag gtataatccg

<210> 55

<211> 30

<212> nucleic acid

<400> 55

gggttcacgc ctctgtgcgga attctgtggag

<210> 56

<211> 25

<212> nucleic acid

<400> 56

gcgttaccca gagctggatc ctccg

<210> 57

<211> 16

<212> nucleic acid

<400> 57

cagttgtggc tgateg

<210> 58

<211> 17

<212> nucleic acid

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;400&gt; 58

ctttcccaga ctctggc

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; nucleic acid

&lt;400&gt; 59

gctataattt gacgtgagca t

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; nucleic acid

&lt;400&gt; 60

gttcacgtca aattatagca gtgtc

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; nucleic acid

&lt;400&gt; 61

ttgttgteat tctgtgagac actgctataa tttgaacgtg agcagttaac agcc

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; nucleic acid

&lt;400&gt; 62

gttaactgct cacgttcaaa ttatagcaft gtcgcacaga atgacaacaa agaattaaaa

ttg

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 63

<211> 25

<212> nucleic acid

<400> 63

gctagcctcg ggagctctct aggag

<210> 64

<211> 25

<212> nucleic acid

<400> 64

gatctttccc agactctggc cacgc

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05175

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/67, C12N15/52, C12P13/04, C12P13/14,  
C12P19/38, C12N9/02, C12N9/10, C12N1/21

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/67, C12N15/52, C12P13/04, C12P13/14,  
C12P19/38, C12N9/02, C12N9/10, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST771M (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	FOURNIER, B. et al. "Strength and regulation of the different promoters for chromosomal $\beta$ -lactamases of <i>Klebsiella oxytoca</i> ", Antimicrobial Agents and Chemotherapy (April, 1999) 第43巻, 第4号 p. 850-855	1-16
P, A	JEFFKE, T. et al. "Mutational analysis of the <i>cbb</i> operon (CO <sub>2</sub> assimilation) promoter of <i>Ralstonia eutropha</i> ", J. Bacteriol. (July, 1999) 第181巻, 第14号 p. 4374-4380	1-16
X	JP, 6-502548, A (オルサン) 24. 3月. 1994 (24. 03. 94) &WO, 93/03158, A1 &FR, 2679921, A1 &FR, 2679922, A1 &EP, 551506, A1	17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 12. 99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子 印

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 63-214189, A (旭化成工業株式会社) 6.9月.1988 (06.09.88) パテントファミリーなし	1-16

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1乃至16に係る発明は、コリネ型細菌の染色体上のアミノ酸又は核酸合成系遺伝子のプロモーター配列に変異をおこさせて変異体を調製することを特徴とするアミノ酸又は核酸産生能が向上したコリネ型細菌の調製方法、該プロモーターを有する遺伝子、生産菌、及び該生産菌を培養することによるアミノ酸又は核酸の製造方法についての発明である。

請求の範囲17に係る発明は、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌を培養することによるL-グルタミン酸の製造方法についての発明である。

ここで、請求の範囲1乃至16に係る発明と請求の範囲17に係る発明は、共通の主要部を有さず、単一の一般的発明概念を形成しているとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05175

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/67, C12N15/52, C12P13/04, C12P13/14,  
C12P19/38, C12N9/02, C12N9/10, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/67, C12N15/52, C12P13/04, C12P13/14,  
C12P19/38, C12N9/02, C12N9/10, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	FOURNIER, B. et al. "Strength and regulation of the different promoters for chromosomal $\beta$ -lactamases of <i>Klebsiella Oxytoca</i> ", Antimicrobial Agents and Chemotherapy (April, 1999), Vol. 43, No. 4, pages 850-855	1-16
P, A	JEFFKE, T. et al. "Mutational analysis of the cbb operon (CO <sub>2</sub> assimilation) promoter of <i>Ralstonia eutropha</i> ", J. Bacteriol., (July, 1999), Vol. 181, No. 14, pages 4374-4380	1-16
X	JP, 6-502548, A (Orsan), 24 March, 1994 (24.03.94) & WO, 93/03158, A1 & FR, 2679921, A1 & FR, 2679922, A1 & EP, 551506, A1	17
A	JP, 63-214189, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 06 September, 1988 (06.09.88), (Family: none)	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 December, 1999 (17.12.99)

Date of mailing of the international search report  
28 December, 1999 (28.12.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05175

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims 1 to 16 relate to a process for preparing a corynebacterium having as improved amino acid- or nucleic acid-productivity characterized by preparing mutants by mutating the promoter sequence of an amino acid or nucleic acid biosynthesis gene on the chromosome of the coryne bacterium, a gene having the promoter, the producing bacterium and a process for producing an amino acid or nucleic acid by culturing the producing bacterium.

Invention as set forth in claim 17 relates to a process for producing L-glutamic acid by culturing a L-glutamic acid-producing coryne bacterium which is tolerant to 4-fluoroglutamic acid.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 16 and the invention as set forth in claim 17 have no principal part in common and thus cannot be considered as forming a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.